

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN S AKTIVNÍ SLOŽKOU PRO
KOSMETICKÉ APLIKACE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

RENATA PAVELKOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN S AKTIVNÍ SLOŽKOU PRO KOSMETICKÉ APLIKACE

APPLICATION OF NANOPARTICLES AND NANOFIBERS WITH ACTIVE COMPOUND IN COSMETICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

RENATA PAVELKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0939/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Renata Pavelková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Petra Matoušková	

Název bakalářské práce:

Využití nanočástic a nanovláken s aktivní složkou pro kosmetické aplikace

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na materiály a postupy používané k přípravě nanočástic a nanovláken pro kosmetické účely
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod přípravy nanostruktur, enkapsulace a analýzy aktivních složek.
3. Experimentální studie - různé způsoby enkapsulace přírodních a syntetických UV filtrů pro zevní aplikace.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Renata Pavelková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá využitím nanočástic a nanovláken s aktivní složkou pro kosmetické aplikace. Teoretická část je zaměřena na vlivy UV záření na kůži a látky, které jsou používány k fotoprotekci kůže. Dále byly charakterizovány materiály a postupy používané k přípravě nanočástic a nanovláken pro enkapsulaci aktivních látek.

Experimentální část se zabývá přípravou liposomů a marinosomů s aktivní látkou. U těchto částic byla sledována velikost, stabilita měřená pomocí zeta potenciálu a také dlouhodobá stabilita jak samotných částic, tak částic v modelových prostředích. Nakonec byly provedeny pilotní experimenty optimalizace přípravy nanovláken pomocí elektrospinningu.

ABSTRACT

Presented bachelor thesis is focused on application of nanoparticles and nanofibers with active compound in cosmetics. The theoretical part is aimed at effect of UV radiation on the skin and compounds that are used in photo protection of the skin. The materials and methods used in nanoparticle and nanofiber preparing were characterized.

The experimental part deals with preparing of liposomes and marinosomes with active compound. Particles size, stability measured using zeta potential and stability in model environment were observed. Finally, pilot experiments of optimization of nanofibers preparation using electrospinning were carried out.

KLÍČOVÁ SLOVA

UV filtry, antioxidanty, enkapsulace, liposomy, stabilita, elektrospinning

KEYWORDS

UV filters, antioxidants, encapsulation, liposomes, stability, electrospinning

PAVELKOVÁ, R. *Využití nanočástic a nanovláken s aktivní složkou pro kosmetické aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 60 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a řadu cenných rad. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petře Matouškové a Ing. Jitce Bokrové za ochotu, trpělivost, cenné rady a pomoc při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	UV záření	9
2.2	Kůže	9
2.3	UV filtry	10
2.3.1	Fyzikální UV filtry	10
2.3.2	Chemické UV filtry	11
2.3.2.1	Avobenзон	11
2.3.2.2	Octinoxat	11
2.4	Označení SPF („sun protection factor“)	11
2.5	Reaktivní částice	12
2.6	Antioxidanty	12
2.6.1	Karotenoidy	12
2.6.2	Vitamín E	13
2.6.3	Kyselina L-askorbová	13
2.6.4	Polyfenoly	13
2.7	Enkapsulace.....	13
2.7.1	Liposomy.....	14
2.7.1.1	Odpaření na tenké vrstvě TLE	14
2.7.1.2	RP-TLE	14
2.7.1.3	Sonikace	15
2.7.1.4	Membránová extruze.....	15
2.7.2	Marinosomy	15
2.7.2.1	Charakterizace extraktu lipidů	15
2.7.2.2	Tenkovrstvá chromatografie	16
2.7.2.3	Bazicky katalyzovaná esterifikace a transesterifikace	16
2.7.2.4	Plynová chromatografie	16
2.7.2.5	Mastné kyseliny.....	17
2.8	Charakterizace částic.....	18
2.8.1	Metody charakterizace enkapsulační účinnosti.....	18
2.8.1.1	Kapalinová chromatografie	18
2.8.1.2	RP-HPLC	18
2.8.1.3	UV-VIS spektrometrie	19
2.9	Charakterizace velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla.....	19
2.9.1	Charakterizace stability částic	19
2.10	Emulze.....	20
2.10.1	Mechanismus emulzifikace	20
2.10.2	Analýza emulzí pomocí analytické centrifugace	21
2.11	Vlákna	22
2.11.1	Příprava vláken pomocí elektrospiningu.....	23
2.11.1.1	Polyhydroxybutyrát	23
3	Cíle práce.....	24

4	Experimentální část	25
4.1	Použité chemikálie	25
4.2	Použité přístroje.....	25
4.3	Optimalizace přípravy částic	26
4.3.1	Liposomy.....	26
4.3.1.1	TLE.....	26
4.3.1.2	RP-TLE	26
4.3.1.3	Sonikace	26
4.3.2	Liposomy s přidavkem lipidového extraktu z lososa	27
4.3.2.1	Extrakce lipidů dle Folche.....	27
4.3.2.2	Analýza extraktu lipidů pomocí tenkovrstvé chromatografie	27
4.3.2.3	Analýza extraktu lipidů pomocí plynové chromatografie.....	28
4.4	Stanovení obsahu aktivních látek	28
4.4.1	Stanovení α -tokoferol acetátu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí.....	28
4.4.2	Stanovení β -karotenu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí.....	28
4.4.3	Titrační stanovení kyseliny L-askorbové	29
4.4.4	Spektrofotometrické stanovení katechinu	29
4.5	Stanovení enkapsulační účinnosti	29
4.6	Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta potenciálu.....	29
4.7	Optimalizace složení emulzí	29
4.8	Stanovení vlastností systémů pomocí analytické centrifugace	29
4.9	Dlouhodobá stabilita částic a stability částic v modelových prostředích.....	30
4.10	Stabilita liposomů s β -karotenem.....	30
4.11	Stanovení SPF in vitro.....	30
4.12	Vlákna	31
5	Výsledky a diskuze.....	32
5.1	Optimalizace přípravy nanočástic	32
5.2	Stanovení složení obsahu lipidového extraktu z lososa	32
5.3	Stanovení obsahu aktivních látek	34
5.3.1	Stanovení α -tokoferol acetátu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí.....	34
5.3.2	Stanovení β -karotenu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí.....	34
5.3.3	Titrační stanovení kyseliny L-askorbové	34
5.3.4	Spektrofotometrické stanovení katechin hydrátu.....	34
5.4	Stanovení enkapsulační účinnosti	34
5.5	Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu	35
5.6	Stanovení velikosti částic pomocí DLS	36
5.7	Stanovení stability pomocí zeta potenciálu	38
5.8	Dlouhodobá stabilita částic	39
5.9	Optimalizace složení emulzí	39
5.9.1	Stanovení stability částic v modelových prostředích a dlouhodobá stabilita... 40	40
5.10	Stabilita liposomů s β -karotenem.....	41
5.11	Stanovení vlastností emulzí pomocí analytické centrifugace	42
5.12	Stanovení SPF in vitro.....	45

5.13	Vlákna	46
6	Závěr.....	48
7	Literatura	50
8	Seznam použitých zkratek a symbolů	55
9	Seznam příloh.....	56
10	Přílohy	57

1 ÚVOD

Země je stále ozařována fotony ze slunce. Nadpoloviční většina (56 %) tohoto záření je v infračervené oblasti, poté 39% zastoupení má viditelné světlo a 5 % má UV záření. Přestože je UV záření zastoupeno jen nepatrnou částí, můžeme jeho účinky doslova poznat na vlastní kůži. Reakce kůže na UV záření mohou být jak pozitivní, tak negativní. Malé množství UVB záření je důležité pro syntézu vitamínu D3. Větší množství však vyvolává zánět, zarudnutí a přehřátí. Při opakovaném vystavování UV záření dochází k chronickým změnám, jako je urychlené stárnutí a vývoj kožních karcinomů.

Sama kůže je do jisté míry schopna se chránit proti UV záření, tuto funkci je však důležité podporovat, což mohou mimo jiné zajišťovat i kosmetické přípravky s UV filtry a antioxidanty. Klasické přípravky na ochranu proti slunci obsahují vitamín C, vitamín E a beta-karoten, jelikož mají fotoochranné účinky jak proti UVA, tak proti UVB záření. Další aktivní látky, které lze využít jsou polyfenoly, díky jejich antioxidačnímu účinku. Pro dosažení vyššího fotoprotektivního efektu, stability a potlačení degradace UV filtrů, mohou být tyto látky enkapsulovány do částic, případně do vláken.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 UV záření

Slunce je přirozeným zdrojem elektromagnetického záření. Vyzařuje široké spektrum vlnových délek od nejkratších a nejtvrdsích gama přes rentgenové, ultrafialové, viditelné a infračervené. Záření, které dopadá na zemský povrch je filtrováno průchodem atmosférou a na rozdíl od extraterestrického záření neobsahuje vlnové délky pod 290 nm. Na lidskou kůži tedy dopadá záření ultrafialové (UV), viditelné (VR, 400–760 nm) a infračervené (IR, 760–3 000 nm). UV záření má vlnovou délku od 100–400 nm a je rozděleno do tří pásem (UVA, B a C) [1].

S UVC zářením (100–290 nm) se běžně na Zemi nesetkáme. Díky svému využití při prostorové desinfekci operačních sálů a laboratoří se také nazývá germicidní [1].

UVB záření (290–320 nm) představuje 1 % celého energetického objemu slunečního záření, které dopadá na zemský povrch. Po ozáření kůže vyvolává erytém, pigmentaci, je využíváno v dermatologické fototerapii [1] a přímo poškozuje DNA prostřednictvím tvorby pyrimidinových dimerů [2].

UVA záření (320–400 nm) je zastoupeno 4 %. Je využíváno především v soláriích a v dermatologické fototerapii. Může stejně jako UVB záření vyvolat erytém a pigmentaci, ale při sto- až tisícinásobné dávce. Proniká hlouběji do kůže, může tedy ovlivnit více hlubší struktury v kůži (imunosupresivní efekt, akcelerace aktinického stárnutí) [1]. Vytváří také velmi reaktivní druhy kyslíku, které nepřímo poškozuji DNA [2].

2.2 Kůže

Kůže je jedním z největších orgánů lidského těla. Její vrstevnaté složení umožňuje co nejlépe vykonávat ochrannou funkci rozhraní mezi organismem a zevním prostředím. Kůže (integumentum commune) se skládá ze tří základních částí: *epidermis* (pokožka), *dermis* (korium, škára) a *tela subcutanea* (subcutis, podkoží, podkožní tuková tkáň) [3].

Epidermis je nejsvrchnější a nejtenčí (0,3–1,5 mm) část kůže [3]. Z kosmetického hlediska je tato vrstva velice důležitá, jelikož určuje texturu kůže, její vlhkost a přispívá i k její barvě [4]. Je tvořena především keratinocyty, melanocyty, Langerhansovými a Merkelovými buňkami. *Epidermis* se dělí na pět vrstev: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a nejpovrchovější *stratum corneum* [3].

Pro zevní aplikaci kosmetických přípravků je velice důležitá právě nejsvrchnější vrstva pokožky *stratum corneum*. Je to rohovitá vrstva tvořená korneocyty, buňkami bez jádra. Jsou zrohovatělé, zcela ploché, hustě na sebe kladené a tvoří šestiúhelníkové lamely, které jsou většinou seskupeny do sloupců. Kompaktní spodní část této vrstvy nazýváme *stratum conjunctum* a perifernější část, jež se olupuje, nazýváme *stratum disjunctum* [3]. *Stratum corneum* je pokryto proteinovým filmem, který se nazývá buněčná obálka („cell envelope“), ten pomáhá při zabránění ztráty vody a absorpci nežádoucích látek [4].

Kůže zastává tedy hned několik ochranných funkcí a to chemickou, biologickou a fyzikální.

Chemická bariéra využívá vlastnosti kyselého kožního pláště a acidorezistence keratinu. Agresivnější chemikálie s afinitou k bílkovinám se navážou na keratinocyty a s nimi se

odloučí z kožního povrchu. Chemikálie, které proniknou hlouběji, jsou zachyceny Langerhansovými buňkami a indukují imunologické reakce se všemi důsledky [3].

Biologická bariéra je zajišťována neporušenou rohovou vrstvou, která je překážkou pro koky a jejich enzymy. Kyselé pH ochranného kožního filmu (pH 5–6) působí antimikrobiálně, rezidentní kožní mikroflóra vykazuje antimikrobiální aktivitu proti bakteriím přechodné mikroflóry. Kolonizaci kožního povrchu podporuje přehnaná očista (detergenty, mýdlo), mechanické poškození, hyperkeratóza, macerace styčných ploch a mokvání [3].

Fyzikální bariéra má funkci mechanickou, kdy zajišťuje pevnost, pružnost a soudržnost. Dále funkce elektrické bariéry, která funguje jako elektrický dipól (na povrchu elektronegativní a uvnitř pozitivní). Tímto fyzikálním jevem je ztížena penetrace iontů do kůže a souhlasně nabitě částice prachu, mikrobů a nečistoty jsou odpuzovány. Kůže disponuje také *fotoprotektivní funkcí* (ochrana především proti ultrafialovému záření). Podílí se na ní rohová vrstva, keratohylinové struktury stratum granulosum (odraz), obsah urokanové kyseliny, melaninu, aminokyselin, nukleových kyselin, 3-karotenu a hemoglobinu (absorpce) [3]. Kůže má schopnost se na sezónní výkyvy adaptovat. Využívá k tomu ztlustění pokožky a melanogenezi [1].

2.3 UV filtry

UV-filtry byly vyvinuty jako ochranný prvek před škodlivými vlivy ultrafialového záření. UV záření je v pokožce absorbováno řadou chromoforů, jako je melanin, DNA, RNA, proteiny, aromatické aminokyseliny (např. tyrosin a tryptofan), lipidy, voda a jiné. Absorbování UV záření těmito chromofory vede k různým fotochemickým reakcím a sekundárním interakcím zahrnujícím reaktivní částice (kyslíku a dusíku), které vedou ke škodlivému účinku [5].

Samotná pokožka disponuje řadou antioxidantů a enzymů, které opravují poškozenou DNA. Přesto však může vlivem UV záření docházet k jejímu poškození, mutacím a genetické nestabilitě [2]. Obvykle tvoří obsah UV filtru v kosmetickém přípravku 0,1–10 % [6].

2.3.1 Fyzikální UV filtry

Přidáním anorganického (fyzikálního) UV filtru docílíme odrazu a rozptylu světla. Oba tyto jevy jsou uskutečňovány na širokém spektru záření od viditelného, přes UV až po infračervené. Těmito UV filtry jsou minerální mikročástice jako TiO_2 a ZnO [7].

Fyzikální UV filtry jsou fotostabilní, ale při jejich použití je nutné nanést vyšší vrstvu, aby bylo dosaženo požadovaného účinku [8]. Oxid zinečnatý disponuje lepší UVA ochrannou, zatímco oxid titaničitý vykazuje lepší UVB ochranu. [9].

Miniaturizací částic na velikosti 10–50 nm se sníží rozptyl viditelného světla a posune se k nižším vlnovým délkám až pod rozsah UVA. Tímto se také dosáhne jejich lepší přijatelnosti k využití v kosmetických přípravcích, než jejich větší a neprůhledné varianty. Malé částice mají však vyšší tendenci k agregaci a tím se snižuje efektivita rozptylu světla. Díky vysoké fotostabilitě jsou fyzikální UV filtry využívány především pro sluneční ochranu dětí a lidí, alergických na chemické UV filtry [2].

2.3.2 Chemické UV filtry

Organické UV filtry, také známé jako chemické, jsou zodpovědné za absorpci slunečního záření, především UVB [5]. Většina těchto sloučenin absorbuje jen v určité oblasti a proto je většinou nutné použít kombinaci několika UV filtrů za vzniku produktu s ochranou proti širokému spektru UV záření. Cinamáty a salicyláty jsou často používány v kombinaci s dalšími UVB filtry, aby se dosáhlo zvýšení SPF. Organické a anorganické filtry mohou vykazovat synergistický efekt a také zvyšovat SPF. UVB chemické filtry absorbované záření přeměňují na tepelnou energii [2].

2.3.2.1 Avobenzon

Avobenzon má řadu označení: 1-(4-tert-butylphenyl)-3(4-methoxyphenyl)propane-1,3-dione, butyl methoxydibenzoylmethan, BMDBM, Parsol 1789, Eusolex 9020 [10]. Je to silný UVA filtr, který byl jako první organický UVA filtr povolen v USA (FDA) [2]. Dále je povolený v Evropské unii i Austrálii. Jeho maximální obsah je stanoven na 3–5 % [10]. Bohužel vykazuje omezenou fotostabilitu. Po jedné hodině slunění klesá jeho ochrana proti slunečnímu záření na 50–60 %. Avobenzon může také ovlivňovat stability dalších aktivních látek v opalovacích krémech. Proto byla firmou Neutrogena patentována technologie stabilizace Helioplex („Helioplex stabilizing technology“), která zabraňuje fotodegradaci avobenzonu a kombinuje ho s oxybenzonem a diethylhexyl -2,6-naftalátem [2].

2.3.2.2 Octinoxat

Cinnamáty, zahrnující octinoxat a cinoxat, jsou jedny z nejpoužívanějších UVB filtrů v USA, jelikož nevytvářejí skvrny a jen vzácně způsobují podráždění. Vzhledem k tomu, že vykazují menší účinnost a mají i nižší voděodolnost, vyžadují opalovací krémy s aktivní látkou na bázi cinnamátů častější aplikaci. Přestože po vystavení slunci degradují a tím se snižuje i jejich efektivita, enkapsulační techniky umožňují jejich fotostabilitu zlepšit [2].

2.4 Označení SPF („sun protection factor“)

SPF se používá k označení účinnosti UVB filtru. Výrobek s ochranným faktorem 15 odfiltruje 94 % UVB paprsků, výrobek s ochranným faktorem 30 jich odblokuje 97 % [2].

Tento faktor udává poměr energie UV záření potřebné k vytvoření MED („minimal erythema dose“) v chráněné pokožce ku nechráněné pokožce [11].

$$SPF = \frac{\text{minimální eryt.dávka v chrán. pokožce}}{\text{minimální eryt.dávka v nechrán. pokožce}} \quad (1)$$

Velice jednoduchá a spolehlivá je metoda určení SPF in vitro, kdy se u zředěného vzorku změří absorbance v rozmezí 290–320 nm s krokem 5 nm. Ze získaných dat vypočítáme SPF pomocí Mansurovy rovnice [12].

$$SPF = CF \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (2)$$

Kde CF je korelační faktor (10), EE (λ) je erytmogenní efekt záření při dané vlnové délce, Abs (λ) je spektrofotometrická absorpance vzorku při dané vlnové délce. Hodnoty EE·I jsou konstanty, které stanovili Sayre a kolektiv (1979) a jsou zobrazeny v tabulce 1 [11].

Tabulka 1: Hodnoty konstant EE·I pro sluneční záření o vlnových délkách 290–320 nm s krokem 5 nm.

λ [nm]	290	295	300	305	310	315	320
EE·I	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0837	0,0180

2.5 Reaktivní částice

Reaktivní druhy kyslíku ROS tvoří nedílnou součást metabolismu tkání, tedy i pokožky. Většina kyslíku v těle je použita v buněčném metabolismu. Molekulární kyslík je pomocí řady reakcí, kdy je odstraňován elektron, přeměňován na superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($HO\cdot$), až nakonec na vodu. K většině těchto reakcí dochází v mitochondriích a jsou spojeny s produkcí energie [13].

Superoxidový anion, hydroxylový radikál a peroxylový radikál patří mezi volné radikály, což jsou atomy nebo molekuly s nepárovým elektronem. Tyto částice jsou vysoce chemicky reaktivní s krátkou dobou života. Proto reagují přímo v místě, kde jsou tvořeny [13].

Další reaktivní částice jako je molekulární kyslík, singletový kyslík (1O_2) a peroxid vodíku jsou schopné nastartovat oxidativní reakci a vytvořit tak volné radikály. Společně tyto volné radikály a reaktivní molekuly kyslíku tvoří reaktivní druhy kyslíku (ROS) [13].

2.6 Antioxidanty

Jsou podle definice Halliwell a Gutteridge (1989) jakékoli látky, které jsou již při nízkých koncentracích schopny zpomalovat nebo inhibovat oxidaci substrátu o vysokých koncentracích v porovnání s koncentrací této látky. Takto definované antioxidanty zahrnují jak látky enzymatické, tak neenzymatické povahy [14].

2.6.1 Karotenoidy

Tvoří skupinu barviv od žluté po červenou barvu, které jsou hojně rozšířeny v rostlinách, některých bakteriích a houbách. Jsou tvořeny z isoprenových jednotek a jejich barevnost je způsobena systémem konjugovaných dvojných vazeb [15].

Karotenoidy jsou syntetizovány pouze rostlinami, ale pomocí potravního řetězce se dostávají i do těl živočichů, ve kterých mají specifické funkce, nebo plní funkci důležitých provitaminů. Karotenoidy jsou lipofilní, ale pokud obsahují polární hydroxylové a karbonylové skupiny, mají vyšší afinitu k rozhraní voda/olej [16]. Řada těchto pigmentů je pro-vitaminem A, a proto jsou nezbytné jak pro zvířata, tak pro lidi [15].

Je známo okolo 600 karotenoidů, pro fotoprotekci se hodí zejména β -karoten [1]. Je to lipofilní pigment oranžovo-červené barvy, obsažený v ovoci, zelenině a listnatých rostlinách. Je vstřebáván v dvanáctníku a uchováván v tukové tkáni. Kromě metabolických funkcí vykazuje i antioxidační vlastnosti. Beta-karoten je schopen zhaset singletový kyslík bez degradace a reagovat s volnými radikály jako je hydroxylový, peroxylový a superoxidový [17].

2.6.2 Vitamín E

Vitamín E je hlavním antioxidantem rozpustným v lipidech. Vyskytuje se ve všech částech pokožky od dermis přes epidermis a i ve stratum corneum [18]. Vysoké zastoupení vitamínu E je v rohové vrstvě pokožky, kam je dopravován pomocí mazu [13].

Je tvořen osmi molekulovými formami (čtyřmi tokoferoly a čtyřmi tokotrienoly). Jeho molekuly jsou složeny z hydrofobního pentylového řetězce, který se zabudovává do membrány a polární chromanolové hlavy, která je vystavena na povrchu. Hydroxylové skupiny na chromanolové hlavě jsou nezbytné pro antioxidační aktivitu [13]. Tokoferoly mají fytylový boční řetězec, tokotrienoly mají isoprenoidní polynenasycený řetězec, který je více rigidní [18].

Hlavní funkcí vitamínu E je zabránění lipidové peroxidaci. Když ROS napadne membránové lipidy, peroxidový radikál může vytvořit další peroxidové radikály, a to pak vede k řetězové reakci, která může narušovat strukturní integritu membrány. Tokoferoly a tokotrienoly vychytávají a zhášejí peroxidové radikály a tím ukončují řetězovou reakci. Mohou také zhášet singletový kyslík. Jakmile je vitamín E zoxidován, může být opět regenerován na svou redukovanou formu pomocí kyseliny L-askorbové [13].

2.6.3 Kyselina L-askorbová

Kyselina askorbová je ve vodě rozpustný vitamín [19]. Tento specifický donor elektronů působí jako kofaktor hydroxylačných reakcí zapojených v produkci kolagenu (obsaženého v pojivové tkáni kostí a pokožky), mozkových neurotransmiterů a peptidových hormonů hypofýzy [19].

Vitamín C má také řadu dalších použití. Je silným antioxidantem, který chrání LDL (nizkodenzitní lipoproteiny) před oxidací, snižuje obsah škodlivých radikálů v žaludku a podporuje absorpci železa [21]. Kyselina L-askorbová pomáhá při regeneraci vitamínu E [1].

2.6.4 Polyfenoly

Fenolické sloučeniny jsou přítomny v rostlinách a tím i v naší potravě. Patří mezi sekundární metabolity [22]. Mezi nejběžnější skupiny polyfenolů patří flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. Ochranný účinek polyfenolů spočívá v jejich schopnosti zhášet reaktivní kyslíkové radikály a snižovat jejich tvorbu pomocí chelatace přechodových kovů, především železa, které jsou schopné generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji arterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tím snižovat riziko infarktu myokardu a mozkové mrtvice [23].

Katechin je antioxidant patřící mezi flavonoidy. Vychytává volné radikály a zabraňuje poškození vyvolané radikály u mnoha biologických systémů. Při fyziologickém pH potlačuje tvorbu DNA zlomů. Bylo také potvrzeno, že zabraňuje oxidaci lidské plazmy. Snižuje spotřebu endogenních antioxidantů rozpustných v tucích a inhibuje oxidaci lipidů [24].

2.7 Enkapsulace

Enkapsulace do vesíklů by měla aktivní látky stabilizovat, chránit v kosmetických přípravcích a umožnit jejich postupné a kontrolované uvolňování [25].

Mezi antioxidanty, které je možné inkorporovat do lipidové dvojvrstvy liposomu, patří vitamín E, karotenoidy, flavonoidy rozpustné v tucích [25]. Flavonoidy rozpustné ve vodě a kyselinu L-askorbovou je možné enkapsulovat do střední vodní části liposomu.

2.7.1 Liposomy

Liposomy jsou váčky tvořené přírodními nebo uměle připravenými lipidy (fosfo- a sfingolipidy) a mohou obsahovat další součásti dvojvrstvy jakou je cholesterol a hydrofilní polymery konjugovaných lipidů [26]. Schopnost samotvoření mají díky své amfifilní povaze. Polární hlavička se nasměřuje do polárního rozpouštědla (vody) a tím chrání nepolární konce [27]. Struktura liposomů je identická se strukturou buněčné membrány. Díky této podobnosti byly navrženy jako vhodný nosičový systém pro zlepšení přenosu aktivních látek do kůže [28]. Poprvé byly v 70. letech navrženy pro dopravu léčiv [27].

Liposomy lze rozdělit na několik skupin podle metody přípravy, počtu vrstev a velikosti. Podle lamelarity rozlišujeme jednodamelární liposomy (ULV „unilamellar vesicles“) a multilamelární MLV, podle metody přípravy REV připravované metodou odpařování reverzní fáze, FPV metodou French press, TLE odpaření na tenké vrstvě a EIV vstřikováním etheru nebo popřípadě ethanolu. Poslední je rozdělení podle velikosti SUV malé jednodamelární a LUV velké unilamelární váčky. Klasifikace pomocí lamelarity a velikosti je používáno nejčastěji [29].

2.7.1.1 Odpaření na tenké vrstvě TLE

MLV se tvoří samovolně, pokud je k vysušenému lipidu přidán nadbytek vodního pufru. Nejprve je nutné připravit homogenní směs lipidů v organickém rozpouštědle. Nejčastěji se používá chloroform nebo směs chloroformu a methanolu. Obvyklý obsah lipidů je 10–20 mg na mililitr organického rozpouštědla. Je možné použít i vyšší koncentrace, záleží na rozpustnosti a mísení lipidů. Jakmile jsou lipidy důkladně rozmíchány v rozpouštědle, organické rozpouštědlo se odstraní pomocí odparky a lipidy vytvoří tenký film [30].

Hydratační krok je prováděn při teplotě přechodu lipidu ze stavu gelového do stavu fluidního nebo nad ní. Aktivní látka může být podle své rozpustnosti rozpuštěna ve vodním pufru nebo v organickém rozpouštědle [31].

Lipidový film je nutné důkladně vysušit, aby se dosáhlo úplného odstranění organického rozpouštědla [30]. Doba, po kterou je lipidový film hydratován, intenzita míchání a tloušťka lipidové vrstvy ovlivňuje řadu vlastností liposomu například množství aktivní látky enkapsulované do liposomu, velikost liposomu a lamelarity [29]. Tato technika bohužel často zanechává ve vytvořených liposomech velké množství organického rozpouštědla, což je nežádoucím faktorem.

2.7.1.2 RP-TLE

Tato metoda umožňuje přípravu liposomů s vysokým poměrem prostoru vyplněného vodním roztokem ku množství lipidů, v porovnání s liposomy připravenými ručním třepáním je tento poměr čtyřikrát větší, s vysokým procentovým zastoupením ve vodě rozpustného materiálu. Vznik liposomů je v tomto případě založen na vytvoření převrácených micel [32].

Celý proces se skládá ze dvou kroků. Prvním je příprava emulze fosfolipidů a pufru v přebytku organické fáze, což je emulze vody v oleji a následně odstranění organické fáze při

sníženém tlaku. K vytvoření emulze se často využívají mechanické techniky a ultrazvuk [29]. Pomalým odstraňováním rozpouštědla se z emulze tvořené micelami vytvoří gelovitá hmota. Při dalším odpařování se gel zhroutlí a některé převrácené micely se naruší. Přebytek fosfolipidů vede k seskupení druhé vrstvy okolo micel a tím k vytvoření liposomů. [32].

2.7.1.3 Sonikace

Je nejrozšířenější metodou pro přípravu SUV. Multilamelární liposomy jsou sonikovány pomocí vaničkového nebo sondového sonikátoru. Mezi další metody, kterými lze z MLV připravit LUV a SUV, patří také French press a membránová extruze [32, 33].

Hlavními nevýhodami liposomů připravených pomocí sonifikace, jsou malý vnitřní objem a tím i nižší enkapsulační účinnost, degradace fosfolipidů a sloučenin k enkapsulaci a v neposlední řadě také kontaminace kovy ze sonikační sondy. Během sonikace nemusí dojít k rozbití všech multilamelárních vesikulů, a tak mohou koexistovat spolu s malými unilamelárními vesikly, což je opět nežádoucí [32].

2.7.1.4 Membránová extruze

Při membránové extruzi je suspenze multilamelárních váčků extrudována několikrát přes polykarbonátové membrány se stejnými póry válcovitého tvaru. Střední velikost liposomů se snižuje se zvyšujícím se transmembránovým tlakem a počtem cyklů extruze. Minimální dosažitelná velikost je pak ovlivněna zvolenou velikostí pórů v membráně. Tato metoda je velice často používanou pro redukci MLV na SUV a LUV [33].

2.7.2 Marinosomy

Pro prevenci a léčení kožních onemocnění byly navrženy Marinosomy®, což jsou liposomy z přírodního mořského extraktu lipidů obsahujícího vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Nejvíce jsou mezi PUFA zastoupeny eikosapentaenová (EPA, 20:5n – 3) a dokosahexaenová kyselina (DHA, 22:6n – 3). Přestože se tyto kyseliny přirozeně v pokožce nevyskytují, jsou epidermálními enzymy přeměňovány na protizánětlivé a protirůstové metabolity, které skýtají výhody při poruchách týkajících se zánětů kůže [34].

Pro získání DHA a EPA z komplexních přírodních lipidů lze využít například extrakci lipidů dle Folche. Tato metoda byla navržena roku 1951 Jordi Folchem. Původní postup zahrnoval dva kroky. V prvním je vzorek homogenizován s rozpouštědly (chloroform a methanol v poměru 2:1) a zfiltrován. V druhém kroku je filtrát promyt desetinásobným objemem vody od nelipidických nečistot. Spodní chloroformová fáze obsahuje lipidy a vrchní vodná fáze obsahuje nečistoty. Tento krok zahrnoval ztrátu 1 % lipidů [35].

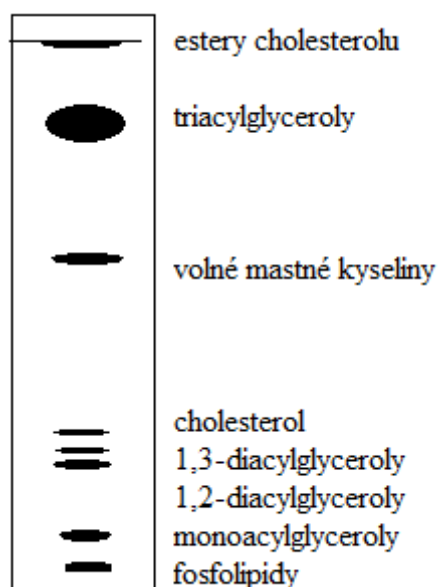
Tato metoda je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem vody a polárních lipidů jako fosfolipidů a komplexních lipidů, tedy zdrojů živočišného původu. Proto se využívá pro analýzu masa a masných výrobků. Methanol umožní kvantitativní extrakci lipidů vázaných na bílkovinné podíly. Ztráty gangliosidů a některých dalších velmi polárních lipidů se dají snížit přidávkou chloridu draselného nebo chloridu vápenatého do promývací vody [36].

2.7.2.1 Charakterizace extraktu lipidů

Pro charakterizaci lipidů se velice často používá TLC a plynová chromatografie. Samotné lipidy však nejsou těkavé, a proto je nutné před analýzou pomocí plynové chromatografie převést mastné kyseliny, které obsahují, na estery.

2.7.2.2 Tenkovrstvá chromatografie

TLC se k analýze lipidů využívá již přes 30 let. Nevyžaduje drahé vybavení a může být využita jak k analytickým, tak k preparativním účelům. Pro separaci skupin lipidů se nejčastěji používají desky se silikagelem obsahující síran vápenatý jako pojivo. Běžně používanou vyvíjecí směsí je hexan:diethyl ether:kyselina mravenčí (80:20:2 objemovým podílům) [37]. Schéma chromatogramu je zobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma separace jednoduchých lipidů na silikagelu pomocí TLC s vyvíjecí směsí o složení hexan:diethyl ether: kyselina mravenčí (80:20:2 objemovým podílům) [37]

2.7.2.3 Bazicky katalyzovaná esterifikace a transesterifikace

Pro transesterifikaci o-acyl lipidů se často využívá metoda bazicky katalyzované esterifikace, jelikož je velice rychlá a probíhá při laboratorní teplotě. Nejčastěji používaným bazickým katalyzátorem je roztok methoxidu sodného v bezvodém methanolu o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ale používají se i methoxid nebo hydroxid draselný [37].

2.7.2.4 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda určená k dělení a stanovení plynů, kapalin i pevných látek s bodem varu do 400°C . Jakožto chromatografická metoda je tedy založena na rozdělování složek mezi dvě fáze, pohyblivou mobilní fází, kterou je zde nosný plyn a nepohyblivou stacionární fází. Stacionární fáze u náplňových kolon může být pevná látka (aktivní uhlí, silikagel, polymerní sorbenty a další) nebo vysokovroucí kapalina nanesená v tenké vrstvě na pevném, inertním nosiči. Kapilární kolony využívají jako nosič stacionární fáze přímo upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry [38].

Nastříknutý vzorek je po odpaření v injektoru unášen nosným plynem do kolony. Jednotlivé složky vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fází a poté desorbují čistým nosným plynem. Každá složka postupuje kolonou vlastní rychlostí a postupně vychází z kolony v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant a vstupuje do detektoru. Detektor

určuje okamžitou koncentraci separovaných látek a tuto informaci plynule registruje a zaznamenává do formy chromatogramu, který určuje závislost signálu detektoru na čase [38].

Molekula složky stráví v koloně určitý čas, který se označuje jako retenční t_R . Tato doba je složena z mrtvého času t_M , kdy molekula zůstávala v mobilní fázi a redukovaného retenčního času t_R' , kdy složka setrvala ve stacionární fázi [39]. Pro vyhodnocení kvality se využívá informace o poloze píku, pro kvantitu plocha píku [38].

Plynový chromatograf obsahuje tyto hlavní části:

- zásobník mobilní fáze (nosného plynu)
- čistící zařízení – zachycuje vlhkost a nečistoty nosného plynu
- regulační systém pro stálý nebo programovatelně se měnící průtok nosného plynu
- dávkovací zařízení
- koncentrátor na počátku kolony
- chromatografická kolona
- termostat se zařízením pro izotermickou analýzu a pro analýzu s programovanou změnou teploty
- detektor
- zařízení na zpracování a záznam signálu detektoru a vyhodnocení analýzy [39].

Nástřik technikou splitless = bez děliče toku

Vzorek je zaveden do horké nástřikové komory, kde je určitou dobu odpařována a poté je unášen přímo do kolony. Tato technika se využívá k analýze zředěných vzorků a relativně velkých objemů, které je nutno použít pro stopovou analýzu [39].

Plamenově ionizační detektor FID

Je nejrozšířenějším detektorem v plynové chromatografii. Má schopnost detekovat téměř všechny organické látky v širokém rozmezí koncentrací. Tento detektor měří změny elektrické vodivosti vodíkového plamene způsobené přítomností eluované organické látky [38].

2.7.2.5 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Často se vyskytují ve formě esterů jako hlavní složky lipidů. Ve vyšších rostlinách a živočiších se nejčastěji vyskytují zbytky kyselin s 16 a 18 atomy uhlíku, především kyseliny palmitová, stearová, linolová a olejová. Většina mastných kyselin má sudý počet uhlíků, jelikož dochází k jejich biosyntéze spojením C_2 jednotek [40].

Podle zastoupení násobných vazeb rozdělujeme mastné kyseliny na nasycené SFA, mononenasycené MUFA a polynenasycené PUFA.

Nasycené mastné kyseliny jsou běžnou složkou přírodních lipidů. Jejich molekuly obsahují 4 až 60 atomů uhlíku a mají rovný, nerozvětvený řetězec. Jejich hlavními zástupci jsou kyseliny palmitová (hexadekanová, 16:0) a stearová (oktadekanová, 18:0) [40].

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou se navzájem liší počtem atomů uhlíku, polohou dvojných vazeb a její prostorovou konfigurací. Mezi hlavní MUFA vyskytující se v lipidech patří kyseliny olejová (cis-oktadec-9-enová, 18:1 cis-9) a palmitolejová (cis-hexadec-9-enová, 16:1 cis-9) [40].

Nenasycených mastných kyselin s několika dvojnými vazbami se v přírodních zdrojích vyskytuje v podstatném množství jen několik. Často se setkáme s jejich tříděním podle polohy

první dvojnás vazby od koncové methylové skupiny. Řada n-6 (ω -6) polyenových kyselin má první dvojnás vazbu na šestém uhlíku od konce řetězce [40]. Vyskytují se především v rostlinných olejích, obsahují i protizánětlivý mediátor kyseliny arachidonové [1]. Obdobně pak u řady n-3 (ω -3) se nachází první dvojnás vazba na třetím uhlíku od methylového konce molekuly [40] a vyskytují v rybím tuku [1]. Nejvýznamnějšími zástupci jsou kyselina linolová (9cis,12cis-oktadeka-9,12-dienová kyselina, 18:2 cis-9, cis-12), její zkrácený zápis je 18:2n-6. Výskyt masných kyselin s třemi až šesti dvojnými vazbami je méně častý. Významnými zástupci jsou kyselina linolenová s třemi dvojnými vazbami, arachidonová se čtyřmi dvojnými vazbami, EPA (eicosapentaenová) s pěti dvojnými vazbami a DHA (dokosaheptaenová) s šesti dvojnými vazbami [40].

2.8 Charakterizace částic

Aby bylo možné připravené liposomální částice dále zkoumat a porovnávat jejich vhodnost pro vybraná uplatnění, je nutné je charakterizovat z hlediska enkapsulační účinnosti, velikosti a stability.

2.8.1 Metody charakterizace enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost nám udává, kolik procent z aktivní látky se inkorporovalo do liposomů, ať už do jejich dvojvrstvy nebo do vnitřní kavity. Abychom mohli určit enkapsulační účinnost, je nutné nejprve určit koncentraci aktivní látky v okolním roztoku.

Podle povahy enkapsulovaných látek bývají pro stanovení jejich obsahu zvoleny metody jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UV-VIS spektrofotometrie a titrační stanovení.

2.8.1.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda založená na separaci složek vzorku mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Pohybem mobilní fáze je vzorek unášen soustavou. Jednotlivé složky vzorku jsou zadržovány stacionární fází různě dlouho, tak jsou od sebe separovány. Na dělení se podílejí interakce složek vzorku se stacionární fází a rovněž také zvolená mobilní fáze [39].

Pro zvýšení účinnosti kapalinová chromatografie se během posledních let vyvinula HPLC („High Performance Liquid Chromatography“). Její výhodou je vysoká rychlost a účinnost, kterých je dosaženo díky vysokému průtoku a tlaku mobilní fáze a díky použití krátkých kolon naplněných jemnými částicemi. Pohyb eluentu je zabezpečen vysokotlakým čerpadlem [39].

Přestože je kapalinová chromatografie méně citlivá (menší rozlišení), je velice často využívána ke kvantitativním analýzám, jelikož umožňuje analýzu i málo těkavých sloučenin [6].

2.8.1.2 RP-HPLC

Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi, neboli reverzní chromatografie („Reversed-Phase Chromatography“, RP) s nepolární stacionární a polární mobilní fází, umožňuje separaci velkého množství organických sloučenin, ale i komplexů elektricky neutrálních, popřípadě s omezenou polaritou. Retence sloučenin klesá v řadě: aklany > aromáty >

halogenové deriváty uhlovodíků > ethery > nitrosloučeniny > estery > aminy > amidy > karboxylové kyseliny > sulfonové kyseliny [42].

Nejčastěji se jako detektor využívá UV-VIS spektrometr. Může být použit jak spektrometr s jednou vlnovou délkou nebo detektor s diodovým polem DAD, který umožňuje snímat pro každý pík celé spektrum a tím posloužit i pro identifikaci [6].

2.8.1.3 UV-VIS spektrometrie

Jak již bylo zmíněno výše, spektrometrie bývá velice často používána při detekci po separaci pomocí chromatografie. Je možné ji však použít i jako samostatnou metodu.

Absorpční spektrofotometrie patří mezi optické metody založené na interakci vzorku s elektromagnetickým zářením. Oblast použitého záření se pohybuje od UV v rozmezí 200–400 nm do viditelného záření 400–800 nm [39].

Kvantitativní analýza je založena na Lambert-Beerově zákoně, kdy hodnota absorbance A je přímo úměrná látkové koncentraci c [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] při dané vlnové délce a závislá na tloušťce kyvety l [cm] a molárním absorpčním koeficientu ε_λ [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Platnost tohoto zákona je dodržena pro monochromatické záření při nízkých koncentracích (menších než $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) [39].

Pokud bychom chtěli určit obsah UV-filtru již v kosmetickém přípravku, byla by naše práce ztížena faktem, že prostředí, v kterém je daný filtr rozptýlen, by mohlo interferovat [6].

2.9 Charakterizace velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla

Částice se v roztoku neuspořádaně pohybují díky tomu, že do nich narážejí okolní molekuly. Tento pohyb je označován jako Brownův pohyb. Rychlost pohybu částic závisí na jejich velikosti. Je známo, že malé molekuly se v roztoku pohybují rychleji a velké pomaleji. Tento pohyb částic neustává, a proto pořídíme-li za sebou dva snímky ve velice krátkém časovém sledu (100 μs), můžeme vidět, jak moc se částice pohnula, a tak zjistit i jak je velká. Pokud známe vztah mezi difúzní rychlostí a velikostí, můžeme určit velikost částice [43].

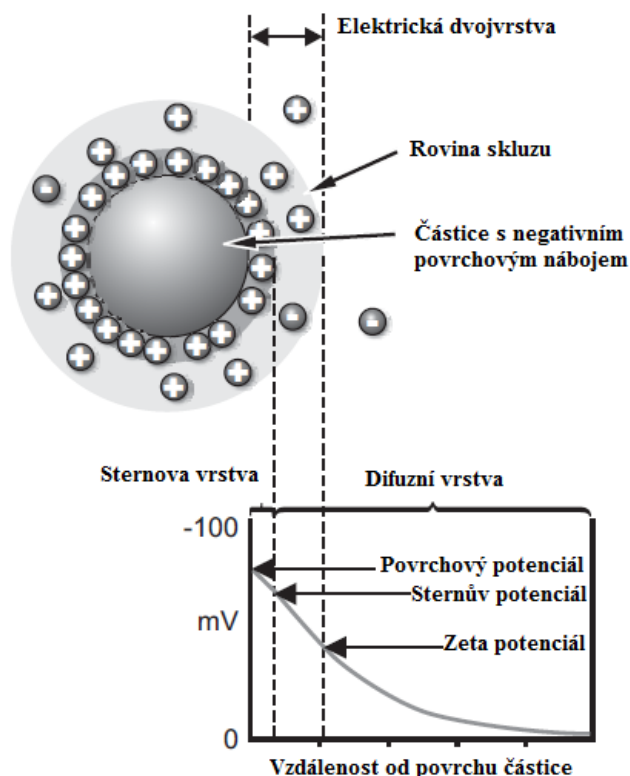
Dynamický rozptyl světla (PCS – fotonová korelační spektroskopie) měří Brownův pohyb a vztahuje ho k velikosti částice. Částice vzorku jsou osvětlovány laserem a následně jsou analyzovány odchylky intenzity rozptylu světla [43].

2.9.1 Charakterizace stability částic

Zeta potenciál se měří pomocí kombinace elektroforézy a laserové Dopplerové velocimie (laserová Dopplerová elektroforéza). Tato technika měří, jak rychle se částice pohybují v kapalině v elektrickém poli. Jakmile známe rychlost pohybu částice a velikost použitého elektrického pole, můžeme pomocí dvou známých konstant vzorku (viskozita a dielektrická konstanta) vypočítat zeta potenciál [43].

Rozsah zeta potenciálu udává potenciální stabilitu koloidního systému. Pokud mají veškeré částice systému výrazně negativní nebo pozitivní zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat a naopak nebudou mít tendenci k shlukování. Pokud však mají částice nízký zeta potenciál, nepůsobí na ně žádné odpudivé síly a dochází k flokulaci. Všeobecně se za hraniční hodnoty považují -30 mV a $+30 \text{ mV}$. Pokud je zeta potenciál mezi těmito hodnotami, pak

takovéto částice považujeme za nestabilní [43]. Obrázek 2 znázorňuje částici s negativním povrchovým nábojem, její elektrickou dvojvrstvu a zeta potenciál.



Obrázek 2: Znázornění částice se záporným povrchovým nábojem. Převzato a upraveno z [43].

Hodnota zeta potenciálu je výrazně závislá na pH. Hodnota pH, při které je částice neutrální se nazývá isoelektrický bod. Při tomto pH je systém nejméně stabilní [43].

2.10 Emulze

Pro sledování vlastností a především stability částic v modelovém prostředí byly z důvodu použití v kosmetice vybrány emulze. Z velkého množství kosmetických výrobků patří právě emulze mezi nejpoužívanější. Pokud má emulze kapalný charakter, označujeme ji jako lotion (pleťovou vodu). Krém je pak emulze vyskytující se v polotuhém stavu [44].

Podle IUPAC jsou emulze definovány jako kapičky tekutiny nebo fluidní krystaly dispergované v kapalině. Dispergovaná fáze je také označována jako vnitřní a vnější fáze jako kontinuální. Pokud je vnitřní fáze lipofilní, např. rostlinný olej nebo parafin dispergovaný v hydrofilním vodním prostředí, získáme emulzi typu oleje ve vodě o/v, v opačném případě pak emulzi vody v oleji v/o [44].

Emulze vykazují veškeré vlastnosti metastabilních koloidů jako je Brownův pohyb, vratný fázový přechod jako výsledek interakcí kapek a nevratný fázový přechod, který obecně zahrnuje jejich zničení [45].

2.10.1 Mechanismus emulzifikace

K vytvoření emulze je nutná voda, olej, surfaktant (povrchově aktivní látka) a energie. Velice důležitá je metoda, kterou použijeme na smíchání všech potřebných komponent. Pokud

chceme vytvořit makroemulzi, tak stačí pouze použít k dispergaci vysokorychlostní míchadlo. Vytváření malých kapek je mnohem složitější a vyžaduje velké množství smáčedla nebo energie [46].

Pro získání emulze s kapkami o průměru v rozmezí 100–500 nm se používá ultrazvuk a vysokotlaký homogenizátor, jelikož obyčejné míchání neposkytuje požadovaný energetický efekt [46].

Přídavek emulgátoru hraje při formování emulzí zásadní roli tím, že snižuje mezifázové napětí. Emulgátory také pomáhají stabilizovat vzniklé emulze. Jak již bylo zmíněno výše, emulze jsou metastabilní systémy a jednotlivé fáze se snaží oddělit díky koalescenci, např. pokud se jednotlivé kapky spojí. Tento proces je tedy možné zpomalit přidáním vhodného surfaktantu [44].

Molekuly emulgátoru se adsorbují na povrchu olejových kapek během homogenizace a zajišťují ochrannou membránu, která brání kapkám ve flokulaci a koalescenci [45]. Hydrofilní část emulgátoru je v kontaktu s vodní fází a lipofilní část je ve styku s lipofilní fází. Velké molekuly mohou svými lipofilními částmi zasahovat až do olejové fáze a tím ji stabilizovat. Přídavek látek zvyšujících viskozitu dále zvyšuje stabilitu emulzí a také zlepšuje konzistenci [44].

2.10.2 Analýza emulzí pomocí analytické centrifugace

Jedním z hlavních důvodů koloidní nestability emulzí je separace fází podle měrných hmotností, obecně označovaným jako sedimentace. Jedná se o proces, při kterém dochází vlivem působení hmotnostní (objemové) síly vyvolané gravitačním zrychlením k oddělení dispergovaných částic od disperzního prostředí. Směr usazování závisí na rozdílu hustot, kdy částice s vyšší hustotou než disperzní prostředí se pohybují ve směru gravitačního zrychlení a částice s nižší hustotou proti němu. Proto v případě emulze tuku ve vodě hovoříme o vyvstávání tuku. Rychlost pohybu částice v_u při pomalém usazování, kdy je hodnota Reynoldsova kritéria pro usazování $Re_u < 0,2$, které je obvyklé pro malé částice, vyjadřujeme pomocí Stokesova vztahu. Jelikož je usazování v gravitačním poli obvykle relativně pomalé, je vhodné pro účely hodnocení sedimentační stability proces separace fází urychlit a to tak, že gravitační zrychlení nahradíme zrychlením odstředivým. Často se pro vyjádření odstředivého zrychlení používá relativní násobek tíhového zrychlení.

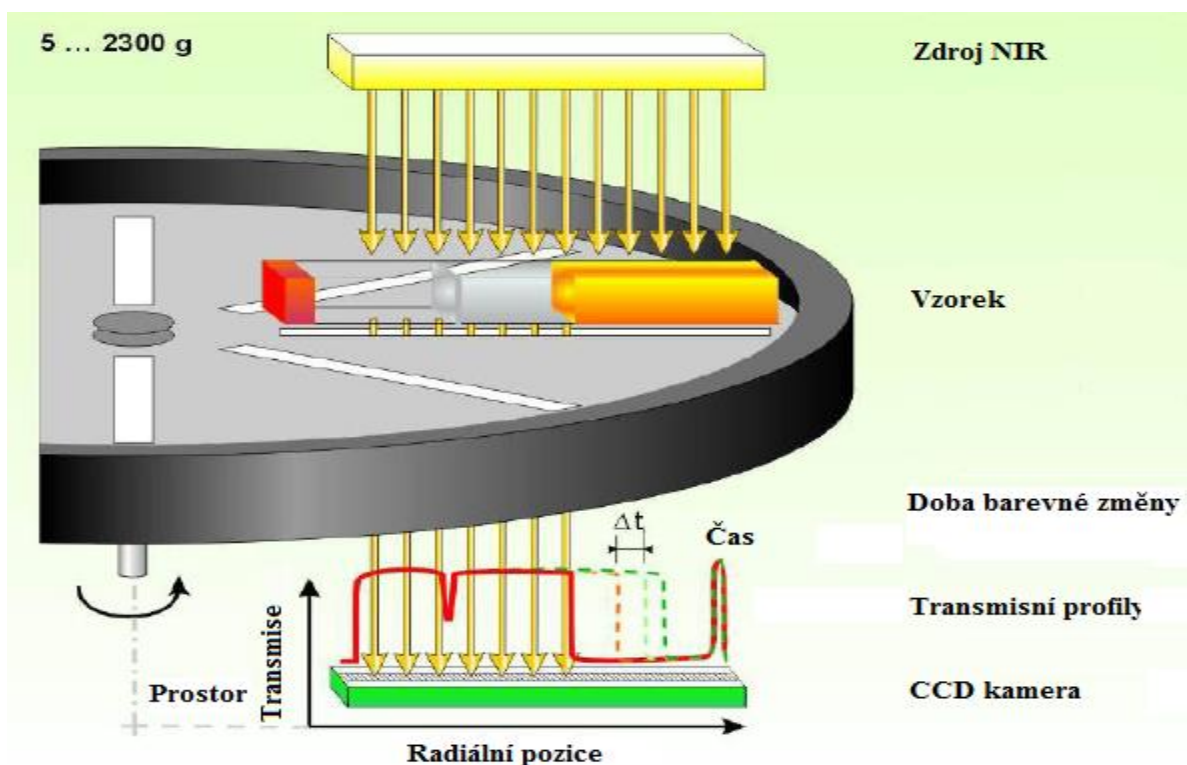
$$a_g = \frac{r \cdot \omega^2}{9,81} \quad (4)$$

Ze závislosti rychlosti usazování na odstředivém zrychlení lze pak extrapolací odhadnout rychlost separace fází při skladování v gravitačním poli. Za předpokladu lineární závislosti pak k tomuto odhadu postačí pouze jeden údaj o rychlosti sedimentace při působení zvoleného odstředivého zrychlení [47].

Pomocí analytické centrifugy tedy můžeme charakterizovat sedimentující částice, jejich molekulové hmotnosti, sedimentační koeficienty a další hydrodynamické vlastnosti (difuzní koeficient). Z naměřených dat získáváme informace o přibližné velikosti a tvaru částic, údaje o distribuci jednotlivých typů částic ve vzorku a můžeme také sledovat rovnovážné systémy a určit jejich rovnovážné konstanty [48].

LUMisizer je temperovaná odstředivka, která umožňuje fotometrické sledování změn koncentrace dispergovaných látek ve vzorku vyvolaných působením odstředivé síly. Vzorky jsou umístěny v kyvetách, ve kterých je ve zvoleném intervalu sledován profil transmitance NIR záření [47].

Sedimentace dispergovaných částic se projeví vyčerením části vzorku, tedy zvýšením transmitance a tvorbou sedimentu, tedy snížením transmitance [47]. Obrázek 3 znázorňuje schéma analytické centrifugy, princip měření a výsledný graf.



Obrázek 3: Schéma analytické centrifugy převzato a upraveno[47]

2.11 Vlákná

Nanovlákná jsou vlákna s průměrem menším než 100 nm a poměrem stran větším než 100. Díky jejich charakteristické morfologii se výrazně liší od vláken s mikrorozměry, především v optických a mechanických vlastnostech. Proto je příprava těchto nanostruktur velice důležitým tématem k výzkumu [49]. Polymerní nanovlákná s podobnou strukturou, jako má extracelulární matrix, mají velký význam v tkáňovém inženýrství při kontrolovaném uvolňování léčiv [50].

Do současné doby již bylo popsáno mnoho metod přípravy nanovláken např. kreslení, samosložení, syntéza pomocí řízené šablony, separace fází a elektrospining. Z výše vyjmenovaných technik je nejvíce používaný díky své jednoduchosti, nízkým nákladům a možnosti zpracování široké škály přírodních i syntetických polymerů právě elektrospining [50].

2.11.1 Příprava vláken pomocí elektrospiningu

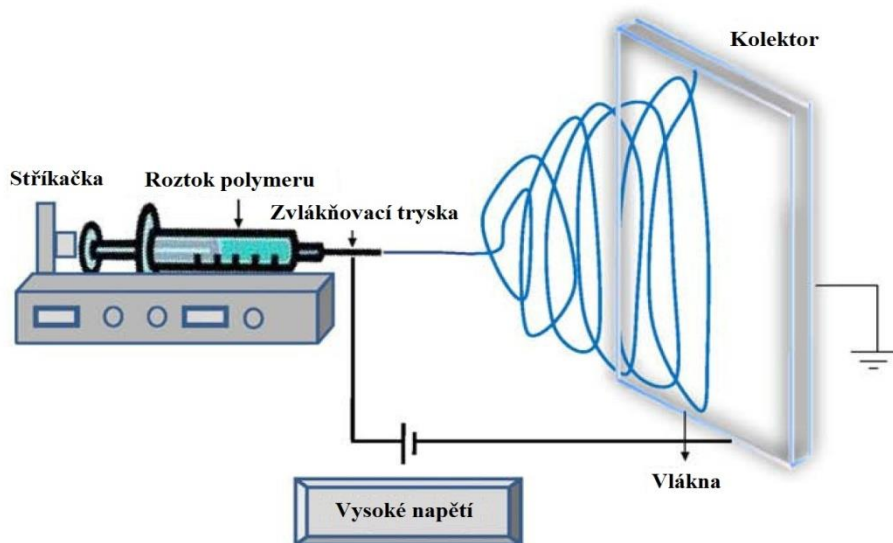
Elektrospining je zvlákňovací technika, která využívá elektrostatické síly k výrobě jemných vláken z roztoku nebo taveniny. Tato vlákna mají tenčí průměr v rozmezí nanometrů a mikrometrů a větší povrch než vlákna spřádaná běžnými technikami [51].

Samotný proces nezahrnuje žádné složité reakce a nevyžaduje ani vysoké teploty, proto je vhodný pro vytváření nanovláken z polymerních biomateriálů a dovoluje ovládat tloušťku a konečné složení nanovláken [52].

Hlavními komponenty systému jsou roztok polymeru, tryska, zdroj vysokého napětí a vodivý kolektor [52]. Celá soustava je znázorněna na obrázku 4.

Roztok polymeru je umístěn do injekční stříkačky s tryskou o objemu v řádech mililitrů. Na kapičku polymerního roztoku, která drží na hrotu jehly díky povrchovému napětí, je přivedeno vysoké napětí. Visící kapka je vysoce elektrizována a indukovaný náboj je rozložen po jejím povrchu. Zvýšením intenzity elektrického pole se tvar kapky změní na kónický, známý jako Taylorův kužel [53].

Jakmile elektrické pole překročí prahovou hodnotu, repulzivní síly překonají povrchové napětí kapaliny a na špičce kuželu se objeví stálý proud. Nabitý proud je přitahován k cíli (kolektoru). Než dopadne na kolektor, tak je vlivem elongace a odpařování rozpouštědla rychle ztenčen a vysušen. Jak se průměr proudu snižuje, hustota povrchového náboje se zvyšuje a vzniklé vysoké repulzivní síly rozdělí proud na několik menších proudů. Výsledkem je ztuhnutí nanovláken neuspořádaně orientovaných na kolektoru [54].



Obrázek 4: Schéma horizontální přípravy vláken pomocí elektrospiningu. Převzato a upraveno [55].

2.11.1.1 Polyhydroxybutyrát

Polyhydroxybutyrát je jedním z nejvíce studovaných polyhydroxyalkanoátů. Tyto polyesteru jsou produkovány různými mikroorganismy, jako jsou půdní bakterie, modro-zelené řasy a některé geneticky modifikované rostliny. U mikroorganismů slouží PHA jako intracelulární zásoba energie a uhlíku, mají tedy velice podobné využití jako glykogen u savců. PHB je biodegradovatelný a biokompatibilní, proto je s výhodou využíván v různých biomedicínských odvětvích [56].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je příprava a charakterizace nanočástic a nanovláken pro aplikaci v kosmetice.

1. Rešerše zaměřená na materiály a postupy používané k přípravě nanočástic a nanovláken pro kosmetické účely.
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod přípravy nanostruktur, enkapsulace a analýzy aktivních složek.
3. Experimentální studie - různé způsoby enkapsulace přírodních a syntetických UV filtrů pro zevní aplikace.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Aceton – LachNer (ČR)
β-karoten 95 % typ I: syntetický – Sigma (SRN)
BRIJ 72 bez antioxidantu – ICI Surfactants (VB)
Carbomer 980: Sino Lion (USA)
2,6-dichlorindofenol – Sigma-Aldrich (SRN)
Diethyl ether>99% – VWR (USA)
DL-α-tokoferol acetát MERCK (SRN)
Ethanol pro UV-spektroskopii – LachNer (ČR)
Eusolex® 2292 – MERCK (SRN)
Eusolex® 9020 – MERCK (SRN)
Chloroform pro HPLC – LachNer (ČR)
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3β-olu – Serva (SRN)
(±)-Katechin hydrát – Sigma (SRN)
Kokosový olej – Purity vision (ČR)
Kyselina gallová – Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina chlorovodíková, 35 % – Vitrum-LachNer (ČR)
Kyselina L-askorbová 99,7 % – Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina octová ≥ 99 % –Sigma-Aldrich (SRN)
Lecithin from soy bean – Serva (SRN)
Methanol pro HPLC, Gradient Grade – Sigma (SRN)
n-hexan pro HPLC – VWR (USA)
Olivový olej – Alnatura (SRN)
Palmový olej – Fabio produkt spol. s.r.o, (SRN)
PHB Lot 720 – Biomer (SRN)
Sucramulse 163 – Alfa Chemicals Ltd (VB)

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy (AND HR-120)
Centrifuga – U-32-R, Boeco (SRN)
IMPLEN Nanophotometer UV-VIS (SRN)
LUMiSizer – Dispersion analyzer – Lum (USA)
Magnetická míchačka: Lavat (ČR)
Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen
Mikroskop – Intraco Micro (ČR)
Optický mikroskop a software DinoCapture
Sestava GC
- Plynový chromatograf TRACE GC – ThermoQuest S.p.A, (Itálie)
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona DB-23 o rozměrech 60m x 0,25 mm x 0,25 μm
Sestava HPLC
- Termostat – Ecom spol s.r.o.LCO 101

- Pumpa – Finnigan Surveyor MS Pump Plus
- Kolona Eclipse plus XDB-C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies – USA)
- Detektor – Finnigan Surveyor PDA Plus detektor

Sestava pro elektrospining

- NE-1000 Single Syringe Pump, Labicom (ČR)
- Regulovatelný zdroj napětí

Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F (USA)

Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)

Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)

Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor – Sonopuls, Bandelin (SRN)

Vakuová odparka – HB4 Basic, HBA Labortechnik (SRN)

Vortex – Genius 3, IKA Vortex (SRN)

ZetaSizer Nano ZS – Malvern (VB)

4.3 Optimalizace přípravy částic

4.3.1 Liposomy

Pro přípravu liposomů byly nejprve porovnávány tři metody: odpařování ten tenké vrstvě, odpařování na tenké vrstvě s reverzní fází a příprava pomocí ultrazvuku.

4.3.1.1 TLE

K 10 ml směsi chloroformu a methanolu o objemovém poměru 8:2 bylo v baňce s kulatým dnem přidáno 80 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu. Takto připravený roztok byl dán na rotační vakuovou odparku a ponechán, dokud nedošlo k úplnému odpaření organických rozpouštědel a vytvoření lipidového filmu. Následně byl tento film rehydratován 10 ml destilované vody a pomocí vanového ultrazvuku a vortexu.

4.3.1.2 RP-TLE

K 10 ml směsi chloroformu a methanolu o objemovém poměru 8:2 bylo v baňce s kulatým dnem přidáno 50 mg lecithinu a 12,5 mg cholesterolu. Takto připravený roztok byl dán na rotační vakuovou odparku a ponechán, dokud nedošlo k úplnému odpaření organických rozpouštědel a vytvoření lipidového filmu. Následně bylo přidáno 8 ml etheru a 2 ml destilované vody. Poté byl vzorek přelit do kádinky a sonikován pomocí tyčového ultrazvuku po dobu 1 minuty. Tato směs byla opět přelita do baňky s kulatým dnem a ponechána odpařit na vakuové rotační odparce. Vzorek byl zředěn 8 ml destilované vody na konečný objem 10 ml.

4.3.1.3 Sonikace

K lecithinu o hmotnosti 450 mg a 50 mg cholesterolu bylo přidáno 20 ml destilované vody. Takto připravený vzorek byl sonikován tyčovým ultrazvukem po dobu 4-15 sekund a chlazen vodou.

Následně byla připravena i řada vzorků o polovičním a čtvrtinovém objemu. Metoda byla vylepšena o krok, kdy byly lecithin s cholesterolem rozpuštěny v chloroformu a po sonikaci byla kádinka se vzorkem dána na magnetickou míchačku s ohřevem, kdy bylo docíleno odpaření chloroformu.

4.3.2 Liposomy s přidavkem lipidového extraktu z lososa

Pro přípravu liposomů s přidavkem lipidového extraktu z lososa byly vybrány pouze metody TLE a upravená metoda sonikace. Jejich složení bylo 10 mg cholesterolu, obsah lipidového extraktu z lososa byl 2,5; 5; 10; 20; 25; 50 a 100 %. Jako zbytek do 100 % byl přidán lecithin.

4.3.2.1 Extrakce lipidů dle Folche

Metoda je dimenzována na 1 g vzorku, kdy je jako rozpouštědlo použit chloroform a methanol v objemovém poměru 2:1.

Vzorek byl homogenizován (obrázek 5) a poté byl 1 g míchán s 20 ml extrakční směsí při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Poté byl extrakt přefiltrován přes skládaný filtr. Vzorek z filtru byl převeden do kádinky a smíchán s 10 ml extrakční směsí (0,5 původního množství) a míchán opět při laboratorní teplotě 30 minut. Extrakty z obou kroků byly smíchány a bylo k nim přidáno 36 ml destilované vody (1,2 násobek) a takto připravená směs byla přelita do centrifugačních kyvet a centrifugována 5 minut při 1 000 otáčkách za minutu. V kyvetách se vytvořily dvě fáze vrchní převážně vodná a spodní převážně chloroformová. Vodní fáze byla opatrně odstraněna. Zbývá chloroformová fáze byla překapána přes bezvodý síran sodný přímo do zvážené baňky s kulatým dnem a následně odpařena na vakuové rotační odparce při 40 °C. Vyextrahované lipidy byly rozpuštěny v 1 ml chloroformu.

Stejný postup byl proveden jak s 1 g vzorku z převážně tuhého podílu, tak i kapalného podílu. Výtěžek extrakce tuhého podílu činil 0,378 6 g a kapalného podílu 0,522 4 g.

Pro získání většího množství extraktu byl homogenizovaný zbytek vzorku 41,84 g extrahován směsí o objemu 210 ml přes noc. Druhý den byla extrakce dokončena podle stejného postupu. Získaný extrakt lipidů byl poté rozpuštěn v chloroformu a výsledná koncentrace extraktu byla 1 g·ml⁻¹.



Obrázek 5: Homogenizát lososového masa

4.3.2.2 Analýza extraktu lipidů pomocí tenkovrstvé chromatografie

Na 5 cm široký pruh silufolu, který byl předem dán na 1 hodinu do sušárny vyhřáté na 80 °C, byly pomocí kapiláry nanесeny vzorky extraktu z lososa. Takto připravený vzorek byl dán do vyvíjecí komory se směsí rozpouštědel.

Složení eluční směsi bylo n-hexan:ether:kyselina octová v objemových poměrech 80:20:1. Vzorek pro analýzu byl před samotnou analýzou převeden do n-hexanu, kdy 0,5 ml vzorku bylo odpařeno pomocí vakuové odparky a následně byl vzorek rozpuštěn ve stejném množství n-hexanu. Vizualizace byla provedena pomocí jodových par.

4.3.2.3 Analýza extraktu lipidů pomocí plynové chromatografie

Pro analýzu byl použit extrakt lipidů z lososa v chloroformu o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, který musel být před samotnou analýzou upraven esterifikací. Vzorek lipidů byl napipetován do předem zvážené baňky s kulatým dnem. Chloroform ve vzorku byl odpařen pomocí vakuové rotační odparky, opět zvážen a poté byl přidán 1 ml n-hexanu. Výsledná koncentrace lipidů ve vzorku činila $333,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Z takto připraveného vzorku bylo odebráno vypočítané množství a dáno do vialky. Následně bylo přidáno 5 ml isooktanu a 0,5 ml metanolického roztoku KOH. Vialka byla 8 minut protřepávána a poté ponechána 6 minut stát. Po této době došlo k oddělení fází a následně bylo možné odebrat z horní isooktanové vrstvy 1 ml pro stanovení methylesterů mastných kyselin pomocí plynové chromatografie.

Podmínky analýzy zahrnovaly teplotní program nastavený nejprve na teplotu 60°C , následně po 10 min začal vzestupný gradient $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 200°C s výdrží 10 min, poté vzestupný gradient $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 220°C s výdrží 15 min a vzestupný gradient $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 240°C s výdrží 10 min. Celková doba analýzy byla 62,67 min. Teplota injektoru byla nastavena na 250°C , „splitless time“ byl 5 min a dávkování bylo zajištěno pomocí autosampleru bez děliče toku (objem dávkovaného vzorku $1 \mu\text{l}$). Nosným plynem byl dusík o průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Jako detektor byl v této sestavě použit plamenově ionizační detektor. Jeho teplota byla nastavena na 250°C , průtok vzduchu na $350 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, průtok vodíku $35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a make-up dusíku na $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.4 Stanovení obsahu aktivních látek

4.4.1 Stanovení α -tokoferol acetátu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí

Stanovení α -tokoferol acetátu bylo provedeno pomocí metody HPLC s UV-VIS detekcí. Vzorky částic byly centrifugovány 5 minut při $14\,800 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Poté bylo odebráno 0,5 ml supernatantu a ten přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 450 nm. Podmínky analýzy byly nastaveny na teplotu 45°C , průtok $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze byla absolutní methanol a kolona Eclipse plus XDB-C18. Detekce byla prováděna při vlnové délce 289 nm. Retenční čas pro α -tokoferol acetát byl 4,26 min.

4.4.2 Stanovení β -karotenu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí

Stanovení β -karotenu bylo provedeno pomocí metody HPLC s UV-VIS detekcí. Vzorky částic byly centrifugovány 5 minut při $14\,800 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Poté bylo odebráno 0,5 ml supernatantu a ten přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 450 nm. Podmínky analýzy byly nastaveny na teplotu 45°C , průtok $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze byla absolutní methanol a kolona Eclipse plus XDB-C18. Detekce byla prováděna při vlnové délce 450 nm. Retenční čas β -karotenu byl 10,10 min.

4.4.3 Titrační stanovení kyseliny L-askorbové

1,5 ml vzorku částic s kyselinou L-askorbovou bylo centrifugováno při 14 800 ot. \cdot min⁻¹ po dobu 5 minut. Na stanovení byl použit 1 ml supernatantu.

Standard kyseliny askorbové o hmotnosti 10 mg byl převeden do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněn po rysku 2% kyselinou chlorovodíkovou. Jako titrační roztok byl připraven 2,6-dichlorindofenol o koncentraci 0,000 5 mol \cdot dm⁻³. K 1 ml standardu bylo přidáno 10 ml 2% kyseliny chlorovodíkové a titrováno do světle růžového zbarvení. K 1 ml vzorku bylo přidáno 10 ml 2% kyseliny chlorovodíkové a titrováno také do světle růžového zbarvení.

Pro vzorky dlouhodobé stability bylo pracováno s polovičním množstvím (0,5 ml vzorku a 5 ml 2% kyseliny chlorovodíkové).

4.4.4 Spektrofotometrické stanovení katechinu

Katechin hydrát byl stanoven pomocí metody stanovení flavonoidů, kdy bylo k 0,5 ml vzorku přidáno 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% dusitanu sodného. Roztok byl promíchán a nechán pět minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% chloridu hlinitého, roztok opět promíchán a po pěti minutách bylo přidáno 1,5 ml 5% NaOH a 1 ml destilované vody. Roztok opět promíchán a po 15 minutách byla měřena absorbance při 510 nm proti blanku (destilovaná voda). Každý vzorek byl připraven dvakrát a ze získaných hodnot byl pomocí MS Excel vypočítán průměr. Pomocí standardu katechinu o koncentraci 1 mol \cdot dm⁻³ byla proměřena závislost absorbance na koncentraci v intervalu od 0,05–0,3 mg \cdot ml⁻¹.

4.5 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena u vzorků obou druhů částic s aktivními látkami (α -tokoferol acetát, β -karoten, kyselina askorbová a katechin hydrát) jako podíl koncentrace enkapsulované látky ku původní koncentraci ve vzorku.

$$EU = \frac{c_{\text{aktivní látka v částicích}}}{c_{\text{aktivní látka celkem}}} = \frac{1 - c_{\text{v roztoku}}}{c_{\text{aktivní látka celkem}}} \quad (5)$$

Obsahy aktivních látek byly stanoveny pomocí metod popsanych v kapitolách 4.3.1–4.3.4.) a následně vypočítána enkapsulační účinnost pomocí výše uvedeného vzorce.

4.6 Stanovení velikosti částic pomocí DLS a stability pomocí zeta potenciálu

Vzorky klasických liposomů a liposomů o obsahu lipidového extraktu 2,5; 5; 10 a 20 % připravené metodou TLE a pomocí ultrazvuku byly vhodně zředěny a proměřeny pomocí přístroje ZetaSizer Nano ZS.

4.7 Optimalizace složení emulzí

Pro přípravu emulzí byly vybrány palmový, olivový a kokosový olej a tři emulgátory BRIJ 72, Sucramulse 163 a lecithin. Obsah olejů v emulzi byl 2; 10 a 30 % a obsah emulgátorů 0,05; 0,1 a 0,5 g na 10 ml emulze. Připravené emulze byly skladovány při laboratorní teplotě a jejich stabilita byla sledována a dále analyzována pomocí analytické centrifugy.

4.8 Stanovení vlastností systémů pomocí analytické centrifugace

Vzorky prázdných nanočástic i nanočástic s enkapsulovanými aktivními látkami byly podrobeny analýze stability pomocí analytické centrifugace v den 0 a den 8.

Byla připravena 10% emulze palmového oleje ve vodě, kdy v 2 ml palmového oleje bylo ve vodní lázni rozpuštěno 0,1 g lecithinu a poté přidáno 8 ml destilované vody. Takto připravená směs byla sonikována pomocí ultrazvuku po dobu 1 minuty při výkonu 80 %. K 0,9 ml takto připravené emulze bylo přidáno 0,1 ml vzorku. Poté byly vzorky v emulzi nadávkovány pomocí stříkačky do kyvet a umístěny do centrifugy.

Parametry analýzy byly nastaveny na čtyři cykly s dobou trvání 2,5 hodiny, při 2 000 ot. · min⁻¹, teplotě 25 °C a spuštěna analýza. Při centrifugaci byla snímána změna transmitance vzorku a hodnoty vyneseny do grafu závislosti transmitance na poloze v kyvetě.

4.9 Dlouhodobá stabilita částic a stability částic v modelových prostředích

Pro sledování dlouhodobé stability byly vybrány pouze částice připravené pomocí ultrazvuku, a to klasické liposomy a liposomy s 10% obsah extraktu z lososa s α -tokoferol acetátem, β -karotenem, kyselinou L-askorbovou a katechin hydrátem.

Tabulka 2: Tabulka složení částic.

aktivní látka [mg]		lecithin [mg]	cholesterol [mg]	voda [ml]
α -tokoferol acetát	12,53	40,08	5,08	5
β -karoten	0,50	40,08	5,08	5
kyselina L-askorbová	60,10	80,16	10,15	10
katechin hydrát	7,65	80,16	10,15	10

Pro zhodnocení stability částic a tedy uvolňování aktivních látek byl použit následující vzorec:

$$\frac{\frac{c_2}{c_1} \cdot 100 \% - (100 \% - EU \%)}{EU \%} \cdot 100 \% \quad (6)$$

Kde c_1 je původní koncentrace aktivní látky, c_2 je koncentrace aktivní látky v roztoku a EU % je enkapsulační účinnost v procentech.

Dále byly připraveny 4 modelová prostředí destilovaná voda, 2; 10 a 30% emulze palmového oleje v destilované vodě. K takto připraveným prostředím byl přidán vzorek tak, aby jeho obsah činil 10 %. Následně byly tyto vzorky analyzovány v časovém rámci 0–25 dnů.

4.10 Stabilita liposomů s β -karotenem

Pro přesnější určení stability liposomů s β -karotenem byly proměřeny stability 4. den pro tři různé koncentrace (1; 3 a 6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) ve čtyřech modelových prostředích (voda; 2; 10 a 30% emulze palmového oleje ve vodě).

4.11 Stanovení SPF in vitro

Vzorky veškerých součástí částic, aktivní látky a chemické UV filtry byly vhodně zředěny ve vhodném rozpouštědle a změřena jejich absorbance na UV-VIS spektrofotometru v rozmezí 280–320 nm s krokem 5 nm dle metody popsane výše v kapitole 2.4.

4.12 Vlákná

Byla připravena vlákna 2% roztoku PHB v chloroformu pomocí metody elektrospinningu. Podmínky přípravy byly: napětí 8,4 kV, průtok $6 \text{ ml} \cdot \text{hod}^{-1}$ a vzdálenost mezi tryskou a kolektorem byla 21,5 cm. Takto připravená vlákna byla pozorována pomocí elektronového mikroskopu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace přípravy nanočástic

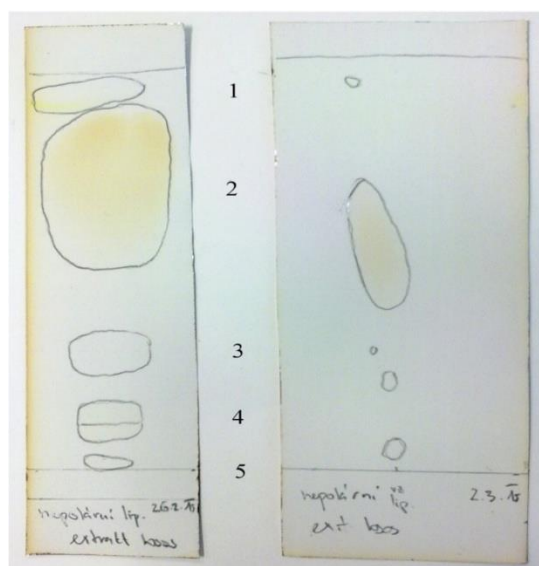
Z metod přípravy popsaných v kapitolách 4.3.1.1, 4.3.1.2 a 4.3.1.3 byla pro další experimenty vybrána pouze metoda přípravy pomocí ultrazvuku vylepšená o přídavek chloroformu. Tento krok zamezil snižování koncentrace liposomů vlivem nedokonalé dispergace lecithinu a cholesterolu ve vodě, jelikož se rozpustily a došlo tak k vytvoření homogeního roztoku. Částice připravené pomocí ostatních metod vykazovaly vyšší nestabilitu při dlouhodobém skladování při laboratorní teplotě. Částice vykazovaly nižší stabilitu, vyšší agregaci a byla tedy pozorována zvýšená sedimentace.

Složení liposomů bylo vždy stejné a to v závislosti na objemu 80 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu na 10 ml.

Složení liposomů s přídavkem lipidového extraktu z lososa se od klasických liposomů lišilo pouze v obsahu lipidového extraktu z lososa, kdy pro další práci byl vybrán pouze 10% přídavek lipidů. Tato koncentrace byla ze zkoušených nejvyšší, při které stále docházelo k vytvoření filmu na baňce při přípravě pomocí metody TLE, a zároveň vykazovala tato koncentrace vysokou stabilitu, což bude diskutováno v dalších kapitolách.

5.2 Stanovení složení obsahu lipidového extraktu z lososa

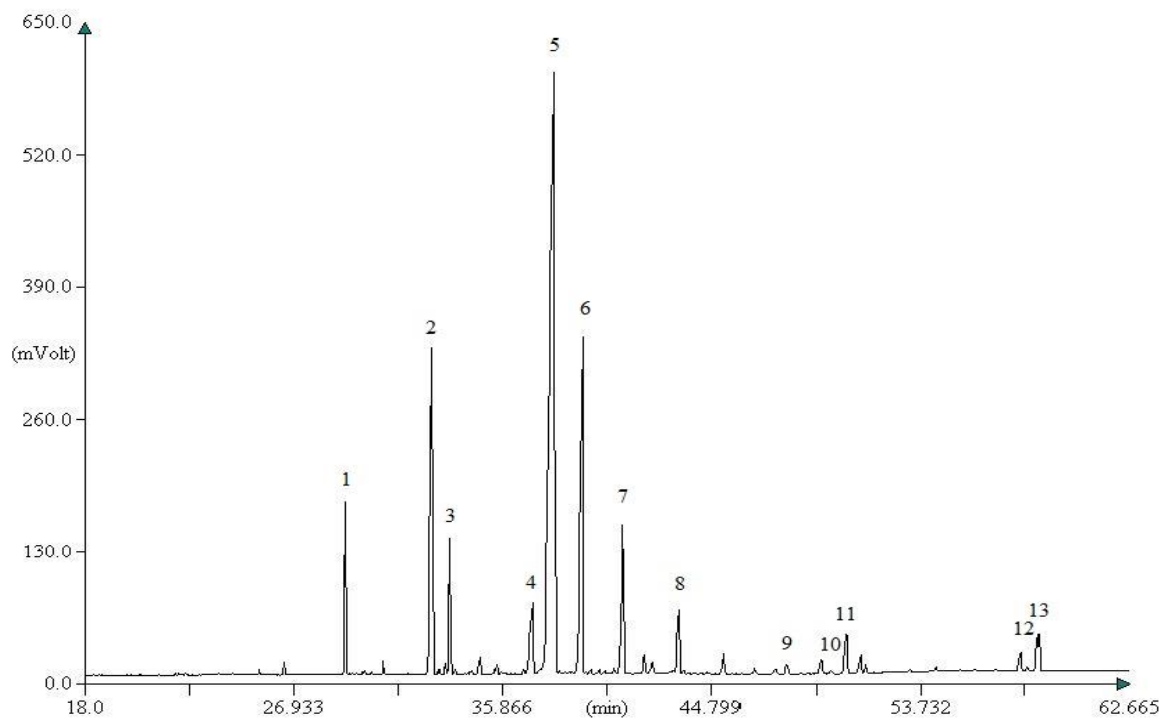
Stanovení složení lipidového extraktu z lososa bylo provedeno pomocí TLC a GC. První metoda nám poskytla pouze všeobecné poznatky o složení vyextrahované směsi. Frakce esterů cholesterolu putovala s čelem chromatogramu, poté byl nejvyšší podíl triacylglycerolů, dále volné mastné kyseliny. Extrakt obsahoval také nejspíše cholesterol, mono- a diacylglyceroly a fosfolipidy. Na obrázku 6 lze pozorovat, jak se rozdělil vzorek při analýze nepochlívání lipidů.



Obrázek 6: Chromatogram analýzy nepochlívání lipidů. 1 – estery cholesterolu, 2 – triacylglyceroly, 3 – volné mastné kyseliny, 4 – cholesterol, di- a monoacylglyceroly a 5 – fosfolipidy

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem poskytla podrobnější informace o složení extraktu. Výstupem byl chromatogram zobrazený na obrázku 7. Vzorek

se skládal jak z nasycených, tak mononenasycených i polynenasycených mastných kyselin v poměru a zastoupení, které popisují tabulka 3 a 4.



Obrázek 7: Chromatogram zobrazující složení extraktu lipidů z lososa

Tabulka 3: Složení extraktu lipidů z lososa

Číslo	masťná kyselina	retenční čas	koncentrace [mg·ml ⁻¹]	symbol	zastoupení [%]
1	Myristová	29,15	0,15	C14:0	3,55
2	Palmitová	32,88	0,63	C16:0	13,12
3	Palmitolejová	33,58	0,18	C16:1 n9c	3,50
4	Stearová	37,12	0,18	C18:0	3,18
5	Olejová	37,77	2,49	C18:1 n9c	48,81
6	Linolová	39,29	0,89	C18:2 n6c	15,67
7	α-linolenová	41,02	0,44	C18:3 n3	6,18
8	Eicosenová	43,41	0,16	C20:1	2,42
9	cis-8,14,17-eicosatrienová 3	47,98	0,03	C20:3 n3	0,38
10	cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenová	49,88	0,01	C20:5 n3	0,16
11	Behenová	50,56	0,37	C22:0	1,95
12	cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenová	58,33	0,01	C22:6 n3	0,14
13	Nervonová	58,76	0,12	C24:1	0,96

Tabulka 4: Zastoupení jednotlivých druhů mastných kyselin v extraktu lipidů z lososa.

mastné kyseliny	zastoupení [%]
SFA	21,05
MUFA	6,55
PUFA	74,82
n3	6,85

Nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová 48,81 %, poté linolová 15,67 % a také palmitová 13,12 %. Extrakt obsahoval i 0,17 % DHA a 0,16 % EPA, které se vyskytují v mořských lipidech.

5.3 Stanovení obsahu aktivních látek

Pro porovnávání a hodnocení jednotlivých částic je důležité analyzovat obsah aktivních látek a tím i enkapsulační účinnost.

5.3.1 Stanovení α -tokoferol acetátu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí

Pro stanovení α -tokoferol acetátu byla použita metoda HPLC s UV-VIS detekcí viz kapitola 4.4.1. Nejprve byly proměřeny standardy α -tokoferol acetátu v rozmezí koncentrací 0,6–0,006 mg·ml⁻¹. Následně byla tato data vynesena do grafu závislosti plochy píku (MA) na koncentraci a proložena přímkou lineární regrese o rovnici (7).

$$MA = 15\,965\,893,19 \cdot c \quad (7)$$

5.3.2 Stanovení β -karotenu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí

Pro stanovení β -karotenu byla použita metoda HPLC s UV-VIS detekcí popsána výše v kapitole 4.4.2. Po proměření standardů o koncentračním rozmezí 5,5–40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ byla takto naměřená data vynesena do grafu závislosti plochy píku (MA) na koncentraci a proložena přímkou lineární regrese o rovnici (8).

$$MA = 213\,224 \cdot c \quad (8)$$

5.3.3 Titrační stanovení kyseliny L-askorbové

Obsah kyseliny L-askorbové byl stanoven pomocí titrační metody popsané v metodické kapitole 4.4.3.

5.3.4 Spektrofotometrické stanovení katechin hydrátu

Katechin hydrát byl stanoven spektrofotometricky pomocí metody stanovení flavonoidů popsané v kapitole 4.4.4. Po proměření standardů o koncentraci 0,7–3 mg·ml⁻¹ byla tato data vynesena do grafu závislosti absorbance na koncentraci a proložena přímkou lineární regrese o rovnici (9).

$$A = 2,7951 \cdot c \quad (9)$$

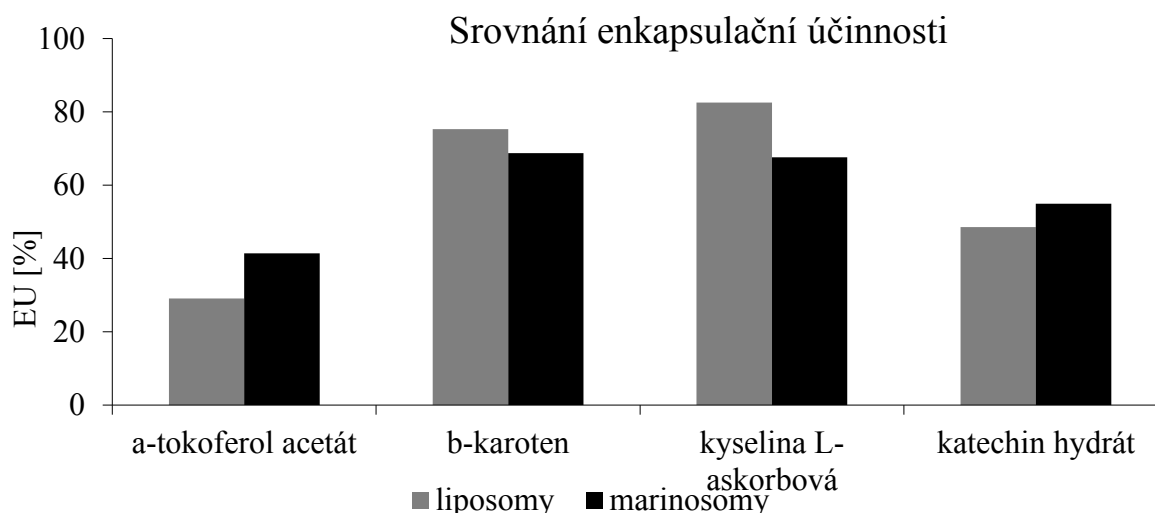
5.4 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla vypočítána pomocí vzorce uvedeného v kapitole 4.5. Vypočítané hodnoty jsou zobrazeny v tabulce 5 a grafu 1.

Tabulka 5: Hodnoty enkapsulačních účinností v procentech pro jednotlivé aktivní látky enkapsulované do částic

	α -tokoferol acetát	β -karoten	kyselina L-askorbová	katechin hydrát
Liposomy	29,1	75,3	82,6	48,6
Liposomy s 10% lipidovým extraktem	41,4	68,8	67,6	55,0

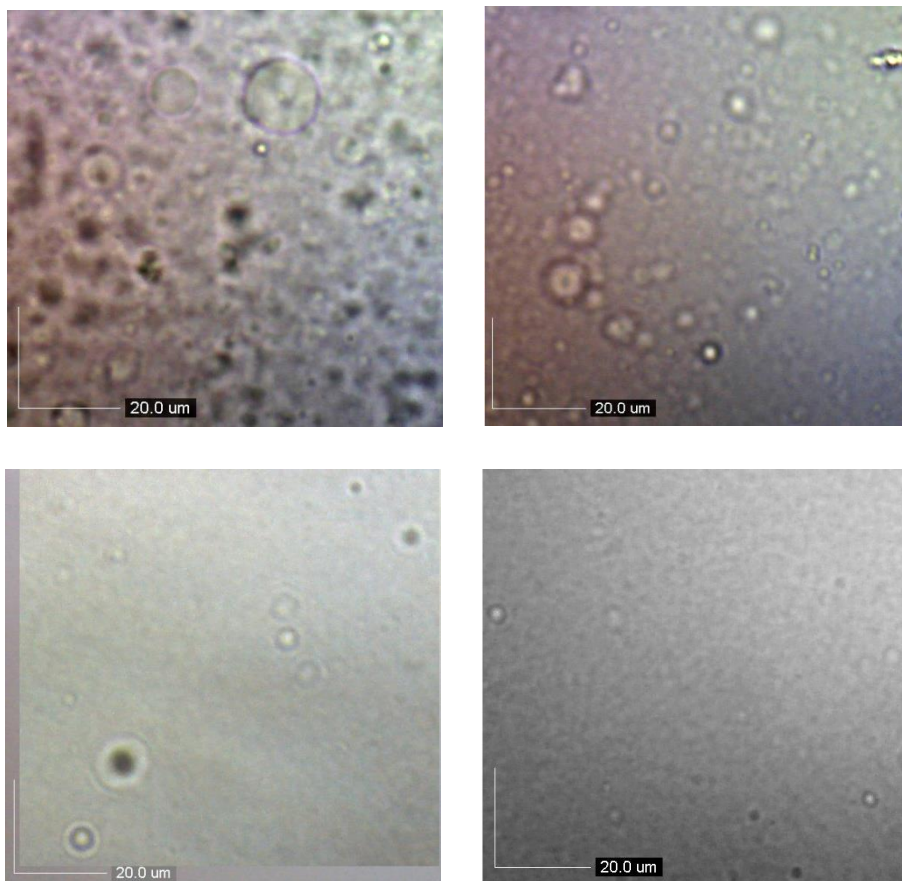
Nejvyšší enkapsulační účinnost měly liposomové částice s kyselinou L-askorbovou 82,6 %, kdy přidavek lipidového extraktu enkapsulační účinnost snížil o 15 %. Velice dobrou enkapsulační účinnost vykazoval také β -karoten, kdy při enkapsulaci do liposomů byla jeho EU 75,3 %. Nejnížší hodnota enkapsulační účinnosti byla pro α -tokoferol acetát v liposomech 29,1 %. Celkově byla EU vyšší v liposomech u β -karotenu a kyseliny L-askorbové a v liposomech s lipidovým extraktem u α -tokoferol acetátu a katechin hydrátu.



Graf 1: Porovnání enkapsulačních účinností (EU) jednotlivých aktivních látek v částicích

5.5 Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu

Částice byly vizualizovány pomocí optického mikroskopu a vyfoceny (obrázek 8). První dvě fotky zobrazují liposomy a marinosomy připravené pomocí metody TLE. Můžeme vidět, že částice jsou větší a dochází i k jejich agregaci. Na dalších dvou fotkách jsou zobrazeny téže částice připravené pomocí sonikace. Většina částic je mnohem menší než částice připravené metodou TLE.



Obrázek 8: Snímky částic z optického mikroskopu (TLE liposomy, TLE marinosomy, ultrazvuk liposomy a ultrazvuk marinosomy)

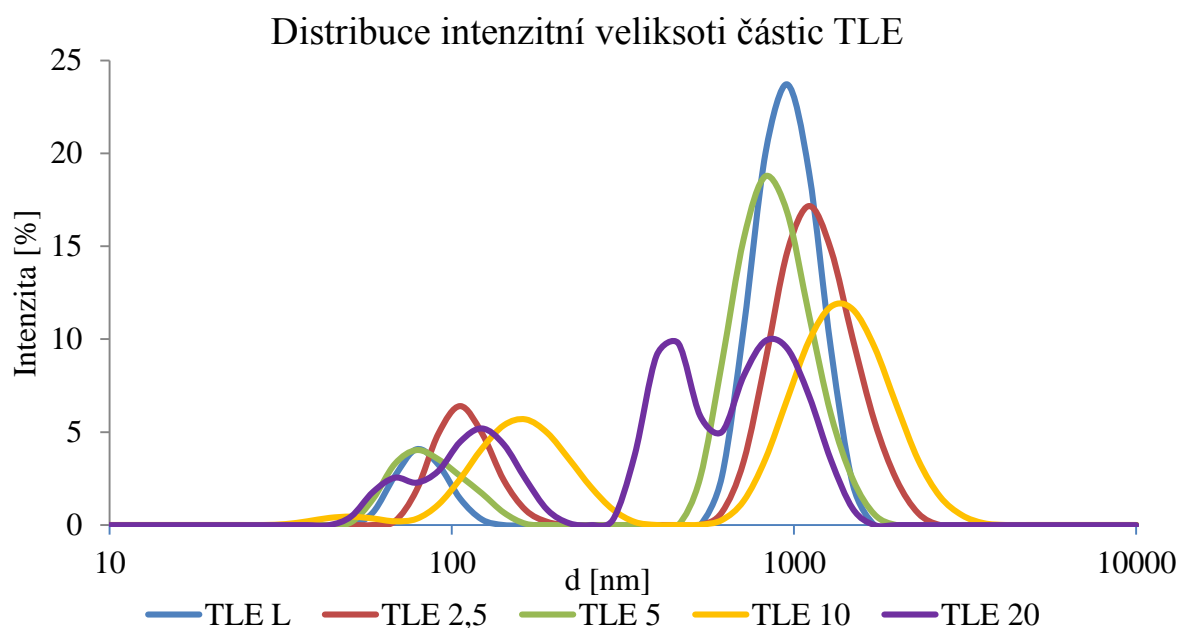
5.6 Stanovení velikosti částic pomocí DLS

Velikost částic byla stanovena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji ZetaSizer Nano ZS. Ze získaných hodnot byly vytvořeny grafy pro distribuci velikosti částic připravené metodou TLE a pomocí ultrazvuku.

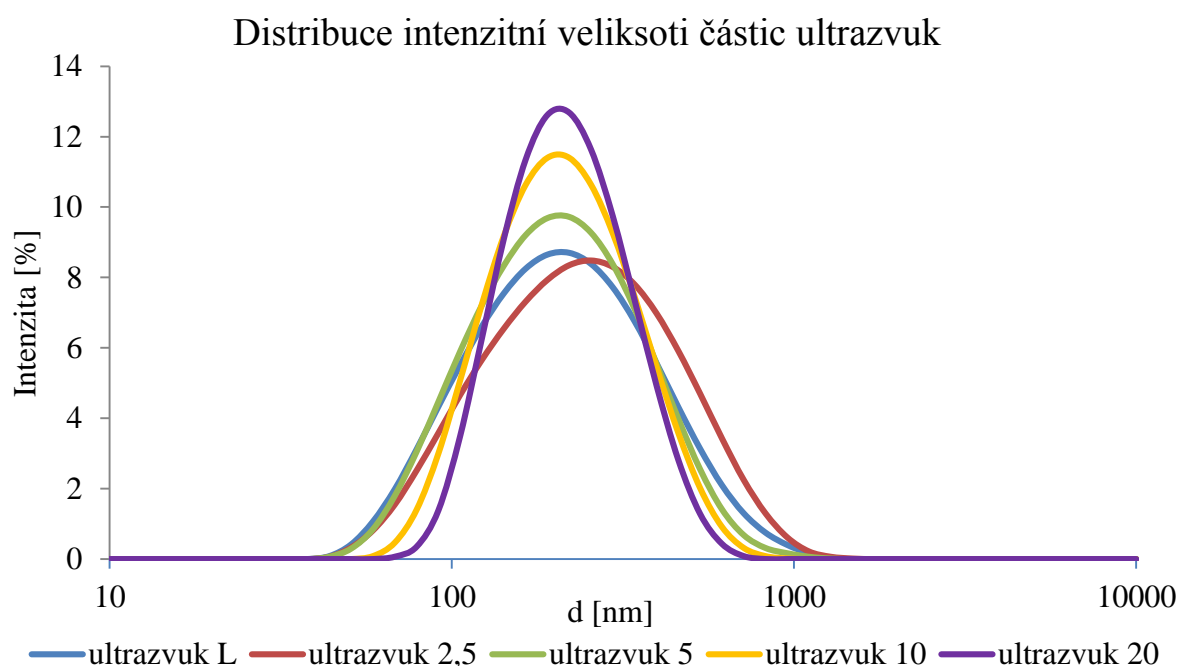
Tabulka 6: Velikosti částic pro jednotlivé frakce (intenzitní data)

typ částic	velikost [nm]	velikost [nm]	typ částic	velikost [nm]
TLE L	774,13	65,67	U L	263,33
TLE 2,5	986,10	95,54	U 2,5	264,97
TLE 5	836,40	79,20	U 5	218,23
TLE 10	1213,50	154,23	U 10	216,93
TLE 20	821,05	98,29	U 20	215,57

Popis vzorků pro tabulku 6 a 7: TLE – příprava částic pomocí odpaření na tenké vrstvě, U – příprava částic pomocí ultrazvuku, L – liposomy, 2,5 – liposomy s 2,5% přídavkem lipidového extraktu z lososa, 5 – liposomy s 5% přídavkem lipidového extraktu z lososa, 10 – liposomy s 10% přídavkem lipidového extraktu z lososa a 20 – liposomy s 20% přídavkem lipidového extraktu z lososa



Graf 2: Distribuce velikosti liposomů a marinosomů připravených metodou TLE.



Graf 3: Distribuce velikosti liposomů a marinosomů připravených pomocí ultrazvuku.

Z grafu 2 je patrné, že částice připravené touto metodou jsou polydisperzní. Obvykle mají dvě frakce velikostí, jednu okolo 100 nm a druhou okolo 1 000 nm. Pro použití do kosmetiky by byly částice o velikosti okolo 1 000 nm odfiltrovány nebo by byl použit membránový extrudér a částice by poté měly více uniformní velikost.

Tabulka 7: Velikosti částic pro jednotlivé frakce (objemová data)

typ částic	velikost [nm]	velikost [nm]	typ částic	velikost [nm]	velikost [nm]
TLE L	701,77	63,44	U L	299,57	83,76
TLE 2,5	1028,93	97,77	U 2,5	370,07	94,77
TLE 5	749,47	75,69	U 5	266,53	90,54
TLE 10	873,65	137,30	U 10	293,40	108,50
TLE 20	708,75	108,00	U 20	221,03	

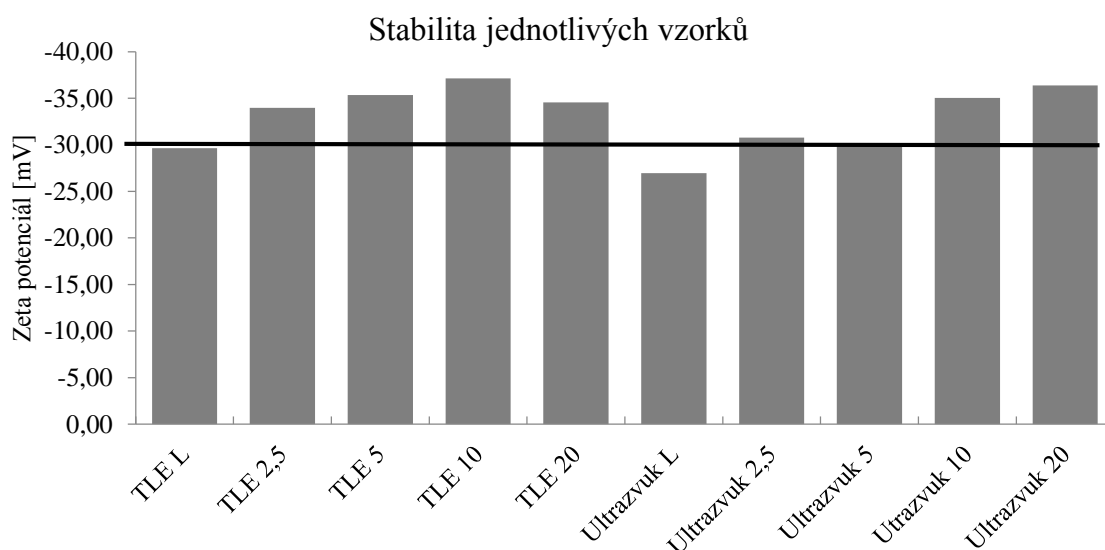
Při porovnávání velikostí částic zobrazených v tabulkách 6 a 7, lze již na první pohled vidět, že objemová data nám ukazují i další frakci částic v nanorozměrech, které intenzitní data nezobrazují, jelikož intenzita odezvy větších částic je vyšší a tím menší částice zastíní.

Graf 3 ukazuje, že částice připravené pomocí ultrazvuku mají hlavní zastoupení velikostí od 200 nm do 800 nm. Dále můžeme říci, že se zvyšujícím se obsahem lipidů extrahovaných z lososa se rozptýl velikostí snižuje a nejvyšší zastoupení mají téměř vždy částice o průměru okolo 400 nm.

5.7 Stanovení stability pomocí zeta potenciálu

Vzorky prázdných liposomů a marinosomů (2,5; 5; 10 a 20% obsah extraktu z lososa) byly proměřeny pomocí přístroje ZetaSizer ZS. Z naměřených dat byl vypočítán průměr a hodnoty zeta potenciálu pro jednotlivé vzorky byly zaznamenány do grafu 4.

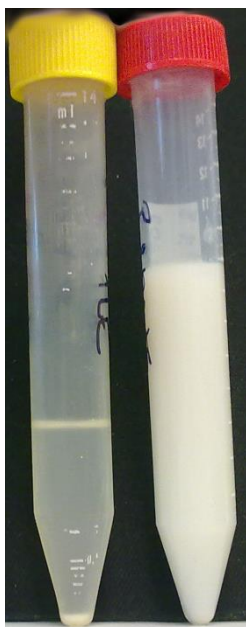
Z grafu 4 je patrné, že za stabilní můžeme označit především vzorek marinosomů připravený metodou TLE s 10% obsahem extraktu z lososa a marinosomy připravené pomocí ultrazvuku s 20% obsahem extraktu z lososa. Celkově vykazují vzorky trend vzrůstající stability při zvyšujícím se obsahu lipidů z lososa. Samotné liposomy jsou při obou typech přípravy vždy nejméně stabilní, tedy pod hranicí -30 mV.



Graf 4: Stabilita vzorků liposomů a marinosomů připravených metodou TLE a pomocí ultrazvuku

5.8 Dlouhodobá stabilita částic

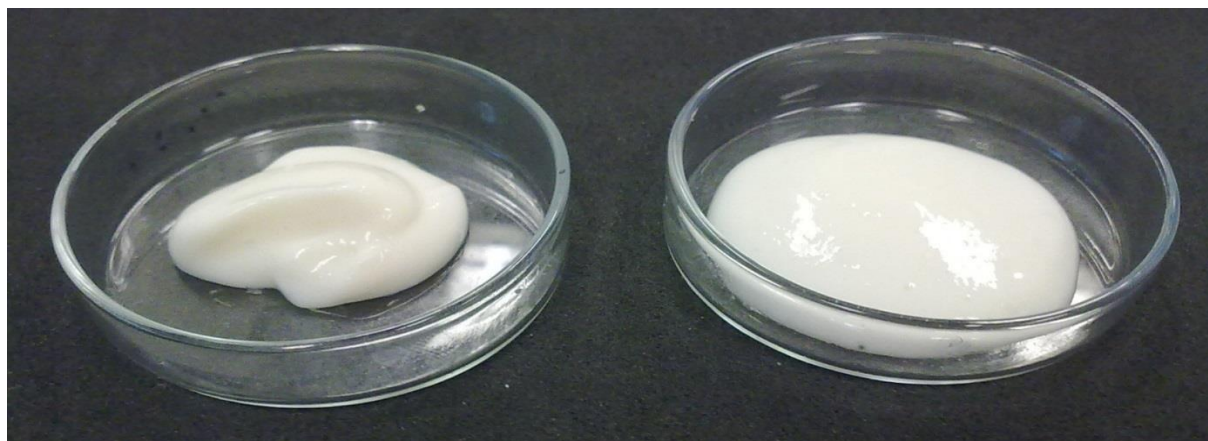
Samotné částice připravené pomocí metody TLE a ultrazvuku byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 3 měsíců. Z obrázku 9 je patrné, že částice připravené pomocí metody TLE po 3 měsících sedimentovaly a zbylý roztok byl vyčeřený. Naopak částice připravené pomocí sonikace stále vykazovaly dobrou stabilitu, kdy roztok byl stále mléčně zbarvený.



Obrázek 9: Liposomy připravené metodou TLE vlevo, liposomy připravené pomocí ultrazvuku vpravo.

5.9 Optimalizace složení emulzí

Byly testovány emulze připravené z různých olejů a emulgátorů popsaných v kapitole 4.7. Jako nejlepší emulze byla vyhodnocena 10% emulze palmového oleje ve vodě stabilizovaná pomocí lecithinu. Tato emulze byla následně použita pro další experimenty. Pro lepší konzistenci finálního výrobku byl přidán karbomer. Tyto vzorky jsou zobrazeny na obrázku 10.



Obrázek 10: Finální výrobek vlevo: 10% emulze palmového oleje ve vodě o 10% obsahu částic stabilizovaná lecithinem a zahuštěná karbomerem, vpravo: 10% emulze palmového oleje ve vodě o 10% obsahu částic stabilizovaná lecithinem

5.9.1 Stanovení stability částic v modelových prostředích a dlouhodobá stabilita

Stabilita částic s enkapsulovanými aktivními látkami byla testována ve čtyřech modelových prostředích, viz kapitola 4.9. Uvolňování aktivní látky bylo vypočítáno pomocí vzorce (5). Získané hodnoty jsou procenta uvolněné aktivní látky, která se enkapsulovala.

Výsledky dlouhodobé stability liposomů s aktivními látkami jsou zobrazeny v tabulce 8. Z tabulky je patrné, že α -tokoferol acetát se výrazně uvolňuje již během prvních čtyř dnů. Pozorujeme také zvýšené uvolňování v modelových prostředích se zvyšujícím se obsahem oleje. Po 25 dnech je stále ve vzorku přítomen, ale pravděpodobně dochází vlivem degradace k poklesu koncentrace.

V případě β -karotenu, který je na světle nestálý, docházelo během sledovaného časového úseku k jeho výrazné degradaci již během prvních několika dnů. V den 0 se v 2% emulzi uvolnilo 42 % a v 10% emulzi téměř 85 % enkapsulovaného β -karotenu.

Kyselina L-askorbová vykazuje postupné uvolňování do 8. dne ve všech modelových prostředích. Během prvních tří odběrů pozorujeme i zvýšené uvolňování v prostředích se zvýšeným obsahem oleje. Po 25 dnech dochází k snížení obsahu pravděpodobně opět vlivem degradace.

U katechin hydrátu je patrné, že se do výhradně vodného prostředí během 25 denní stability neuvolňoval, naopak docházelo výhradně k snižování jeho obsahu v prostředí. Při testování stability v olejových prostředích je vidět kolísání uvolňování v 2% a 10% emulzi. Naopak v prostředí 30% emulze se již 4. den uvolnilo 100 % enkapsulovaného katechin hydrátu, který však v prostředí zůstal po celou sledovanou dobu.

Výsledky dlouhodobé stability liposomů s lipidovým extraktem a enkapsulovanými aktivními látkami jsou zobrazeny v tabulce 9. Při studování uvolňování α -tokoferol acetátu z těchto částic je patrné, že se začíná uvolňovat do výhradně vodného prostředí až během 8. dne. Do 25. dne se do tohoto prostředí uvolnilo jen 38 %. V 2% a 10% emulzích se ihned na počátku inkubace uvolnilo jisté množství α -tokoferol acetátu, které bylo detekováno i po 4 dnech. Následně během dalších dvou odběrů došlo ke snížení obsahu α -tokoferol acetátu v těchto prostředích. V 30% emulzi došlo k okamžitému uvolnění veškerého enkapsulovaného α -tokoferol acetátu ihned po přípravě vzorku. Toto množství v prostředí přetrvalo do 4. dne. Poté se opět koncentrace snižovala.

U β -karotenu nedocházelo k téměř žádnému uvolňování u lipidových částic s 10% obsahem lipidového extraktu z lososa.

Kyselina L-askorbová vykazovala v těchto částicích stejně jako β -karoten vysokou stabilitu, jelikož se uvolňovala do prostředí jen minimálně. Výjimkou byl den 0 v 2% emulzi, kdy se uvolnilo do prostředí téměř 26 %. Tato anomálie od ostatních hodnot však může být způsobena nepřesností stanovení.

Při sledování uvolňování katechin hydrátu nebylo pozorováno žádné výrazné uvolňování do výhradně vodného prostředí. V 2% emulzi se v den 0 uvolnilo 30 %. Poté docházelo během následujících dní k nárůstu uvolňování a 25. den již bylo uvolněno veškeré enkapsulované množství katechin hydrátu. Podobný trend vykazoval i tento vzorek v 10% emulzi, pouze bylo jeho uvolňování rapidnější. V 30% emulzi byl vzorek nestabilní a jeho

výrazné uvolňování proběhlo již během dne 0. Další dny analýzy bylo veškeré enkapsulované množství obsaženo v okolním prostředí.

Tabulka 8: Uvolňování aktivních látek z liposomů v průběhu dlouhodobé stability v procentech.

Den	0				4			
prostředí	Voda	2% olej	10% olej	30% olej	Voda	2% olej	10% olej	30% olej
α -tokoferol acetát	0,0	36,4	72,2	100,0	30,5	39,8	86,4	100,0
β -karoten	0,0	42,4	84,9	ND	30,2	51,5	28,3	-5,6
kyselina L-askorbová	0,0	0,0	6,0	15,1	18,1	24,2	25,7	19,6
katechin hydrát	0,0	41,4	34,7	30,8	-36,6	14,9	51,0	100,0
Den	8				25			
Prostředí	Voda	2% olej	10% olej	30% olej	Voda	2% olej	10% olej	30% olej
α -tokoferol acetát	0,0	5,6	27,7	96,3	2,3	48,2	55,1	54,0
β -karoten	-24,3	-25,2	-24,3	-14,5	ND	ND	-11,8	60,5
kyselina L-askorbová	18,1	21,1	21,1	24,2	0,0	-3,0	1,5	7,5
katechin hydrát	-21,7	62,6	32,7	100,0	-11,1	44,3	76,1	100,0

Tabulka 9: Uvolňování aktivních látek z liposomů s 10% lipidovým extraktem z lososa během dlouhodobé stability v procentech.

Den	0				4			
prostředí	voda	2% olej	10% olej	30% olej	voda	2% olej	10% olej	30% olej
α -tokoferol acetát	0,0	20,0	47,5	100,0	0,0	22,4	39,4	100,0
β -karoten	0,0	-40,5	-18,2	17,1	-14,5	-41,0	-26,9	-16,9
kyselina L-askorbová	0,0	-11,1	25,8	14,8	1,8	-1,8	12,9	0,0
katechin hydrát	0,0	30,5	59,5	79,8	-10,2	46,6	71,0	100,0
Den	8				25			
Prostředí	voda	2% olej	10% olej	30% olej	voda	2% olej	10% olej	30% olej
α -tokoferol acetát	12,4	1,4	17,0	67,2	38,4	8,6	-28,8	-87,0
β -karoten	-30,3	-21,2	-18,5	19,6	36,8	-26,4	-37,3	ND
kyselina L-askorbová	9,2	11,1	9,2	11,1	-12,9	-18,4	-12,9	-3,7
katechin hydrát	-5,1	75,1	84,1	100,0	1,7	15,2	100,0	100,0

5.10 Stabilita liposomů s β -karotenem

Stabilita liposomů s β -karotenem byla porovnávána i pro různé koncentrace, jak je zobrazeno v tabulce 10. Ve vodě se u nižší koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ uvolnilo téměř 50 %. Podobná data byla získána v 2% emulzi. Z této tabulky je patné, že u všech koncentrací β -karotenu je uvolňování v 30% emulzi vždy okolo 20–40 %. Celkově z dat můžeme určit, že maximální množství β -karotenu, které je možné do liposomů připravených pomocí sonikace enkapsulovat je proměnlivá, ale lze enkapsulovat i vyšší koncentrace okolo $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabulka 10: Hodnoty uvolňování karotenu z liposomů pro různé koncentrace ve 4. den

c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	1		3		6	
	c uvolněné	uvolňování [%]	c uvolněné	uvolňování [%]	c uvolněné	uvolňování [%]
Voda	0,51	47,40	ND	ND	ND	ND
2% emulze	0,69	63,44	ND	ND	1,10	18,34
10% emulze	0,50	45,94	0,23	7,71	1,43	23,81
30% emulze	0,22	20,46	1,11	37,03	1,90	31,63

5.11 Stanovení vlastností emulzí pomocí analytické centrifugace

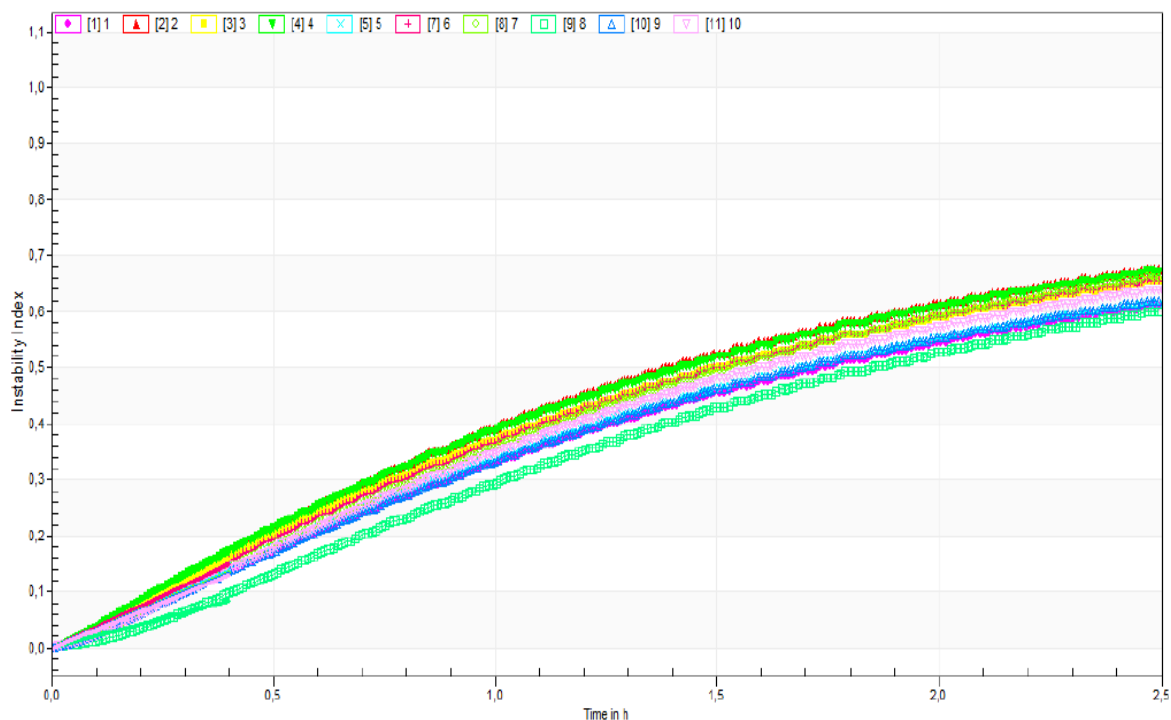
Stanovení stability emulzí bylo provedeno pomocí analytické centrifugace a postupu popsaneho výše (viz kapitola 4.8).

Tabulka 11 a 12 porovnávají indexy nestability jednotlivých vzorků. Sloupec „Slope in 1/h“ udává směrnici křivky ve výše uvedených grafech v prvních fázích centrifugace. Po porovnání indexů nestability byl jako nejstabilnější vyhodnocen vzorek marinosomů s katechin hydrátem při měření v den 0 (vzorek číslo 8 označený tyrkysovými čtverci), jelikož hodnota indexu nestability („Slope in 1/h“) byla u tohoto vzorku nejnižší. V grafu 5 tomuto vzorku (označený tyrkysovými čtverci) náleží nejnižší položená křivka.

Celkově vzorky v den 0 měly vyšší stabilitu než v den 8. Vzorky byly na počátku centrifugace mléčně bílé a k jejich vyčerení došlo až během centrifugace.

Tabulka 11: Porovnání indexů nestability u jednotlivých vzorků den 0

Sample Name	Start in h	End in h	Mean RCF in g	Slope in 1/h	StdDev in 1/h
[01] 1	< 0,01	0,40	535	0,3298	0,0015
[02] 2	< 0,01	0,40	536	0,4287	0,0010
[03] 3	< 0,01	0,40	536	0,3970	0,0014
[04] 4	< 0,01	0,40	534	0,4306	0,0010
[05] 5	< 0,01	0,40	537	0,3436	0,0014
[07] 6	< 0,01	0,40	533	0,3731	0,0018
[08] 7	< 0,01	0,40	531	0,3362	0,0027
[09] 8	< 0,01	0,40	529	0,2111	0,0036
[10] 9	< 0,01	0,40	535	0,3291	0,0017
[11] 10	< 0,01	0,40	532	0,3230	0,0026

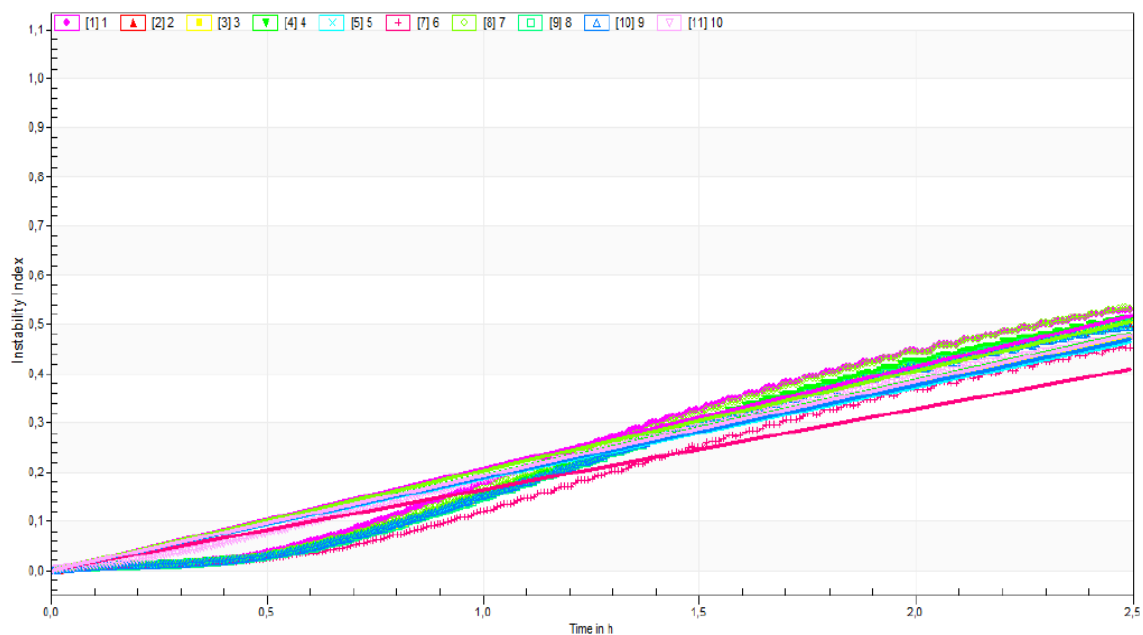


Graf 5: Porovnání indexů nestability u jednotlivých vzorků v den 0

Označení vzorků: 1–4: liposomy s α -tokoferol acetátem, β -karotenem, kyselinou L-askorbovou, katechin hydrátem, 5–8 liposomy s 10% obsahem extraktu z lososů s α -tokoferol acetátem, β -karotenem, kyselinou L-askorbovou, katechin hydrátem, 9 – prázdné liposomy a 10 – prázdné liposomy s 10% obsahem extraktu z lososa.

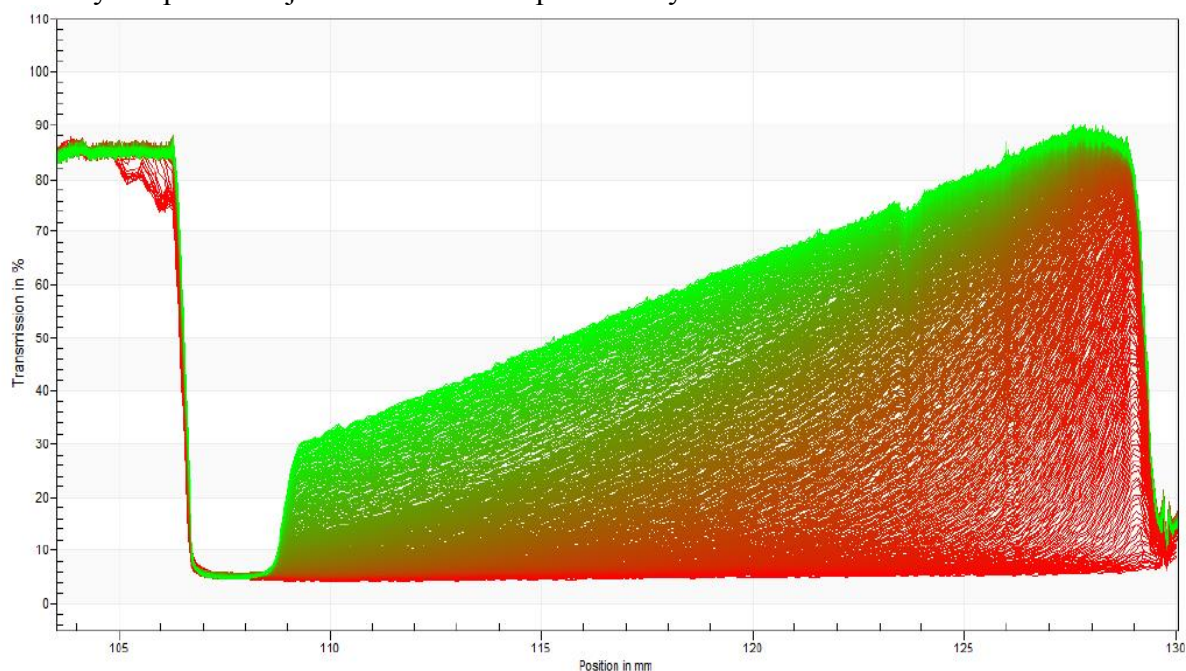
Tabulka 12: Porovnání indexů nestability u jednotlivých vzorků v den 8

Sample Name	Start in h	End in h	Mean RCF in g	Slope in 1/h	StdDev in 1/h
[01] 1	< 0,01	0,40	532	0,4705	0,0012
[02] 2	< 0,01	0,40	532	0,4302	0,0013
[03] 3	< 0,01	0,40	531	0,4292	0,0012
[04] 4	< 0,01	0,40	533	0,4226	0,0013
[05] 5	< 0,01	0,40	532	0,4207	0,0013
[07] 6	< 0,01	0,40	530	0,4056	0,0012
[08] 7	< 0,01	0,40	533	0,4385	0,0012
[09] 8	< 0,01	0,40	531	0,4351	0,0012
[10] 9	< 0,01	0,40	531	0,4438	0,0011
[11] 10	< 0,01	0,40	533	0,5020	0,0018



Graf 6: Porovnání indexů nestability u jednotlivých vzorků v den 8 (popis vzorků viz Graf 5)

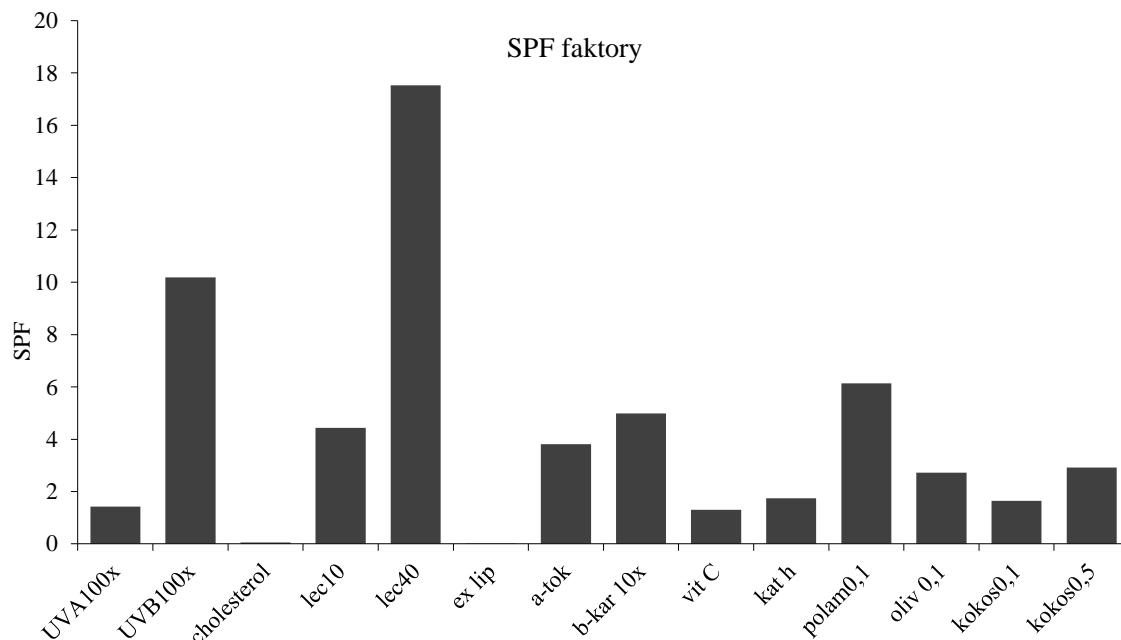
Graf 7 znázorňuje závislost transmitance na poloze v kyvetě u nejstabilnějšího vzorku liposomů s 10% extraktem z lososa s katechin hydrátem při měření v den 0. Během analýzy se vzorek vyčeřoval a transmitance u dna kyvety se zvyšovala. Došlo k vztlínání lipidových částic. Ty se spolu s olejovou částí emulze posunovaly k menisku vzorku.



Graf 7: Graf závislosti transmitance na poloze v kyvetě u nejstabilnějšího vzorku marinosomů s 10% extraktem lipidů z lososa s katechin hydrátem (vz 8).

5.12 Stanovení SPF in vitro

Pro jednotlivé komponenty částic, aktivní látky, organické UV filtry a rostlinné oleje bylo provedeno stanovení SPF („Sun Protection Factor“) pomocí metody popsané v kapitole 4.11. Ze získaných dat byl vypočten SPF pomocí Mansurovy rovnice [12]. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 13 a grafu 8.



Graf 8: Přehled hodnot SPF faktorů pro organické UV filtry, jednotlivé složky částic, aktivní látky a rostlinné oleje

Tabulka 13: Hodnoty SPF pro jednotlivé složky částic, aktivní látky, organické UV filtry a rostlinné oleje.

Vzorek	c [mg·ml ⁻¹]	SPF
UVA	0,01	1,42±0,07
UVB	0,15	10,18±0,27
cholesterol	2,24	0,05±0,01
lec10	2,28	4,44±0,12
lec40	8,30	17,53±0,09
ex lip	4,06	0,01±0,21
a-tok	3,54	3,81±0,03
b-kar	0,42	4,98±0,23
vit C	0,76	1,31±0,00
kat h	0,94	1,75±0,00
palm0,1	0,02	6,14±0,09
oliv 0,1	0,02	2,72±0,01
kokos 0,1	0,02	1,65±0,02
kokos 0,5	0,10	2,92±0,07

Popisky vzorků pro tabulku 13 a graf 8: UVA – Eusolex 9020, UVB – Eusolex 2292, lec10 – lecithin 10 mg na 5 ml, lec40 – lecithin 40 mg na 5 ml, ex. lip – extrakt lipidů z lososa, a-tok – α -tokoferol acetát, b-kar – β -karoten, vit C – vitamín C (kyselina L-askorbová), kat h – katechin hydrát, palm 0,1 – palmový olej 0,1 ml na 5 ml, oliv 0,1 – olivový olej 0,1 ml na 5 ml, kokos 0,1 – kokosový olej 0,1 ml na 5 ml a kokos 0,5 – kokosový olej 0,5 ml na 5 ml.

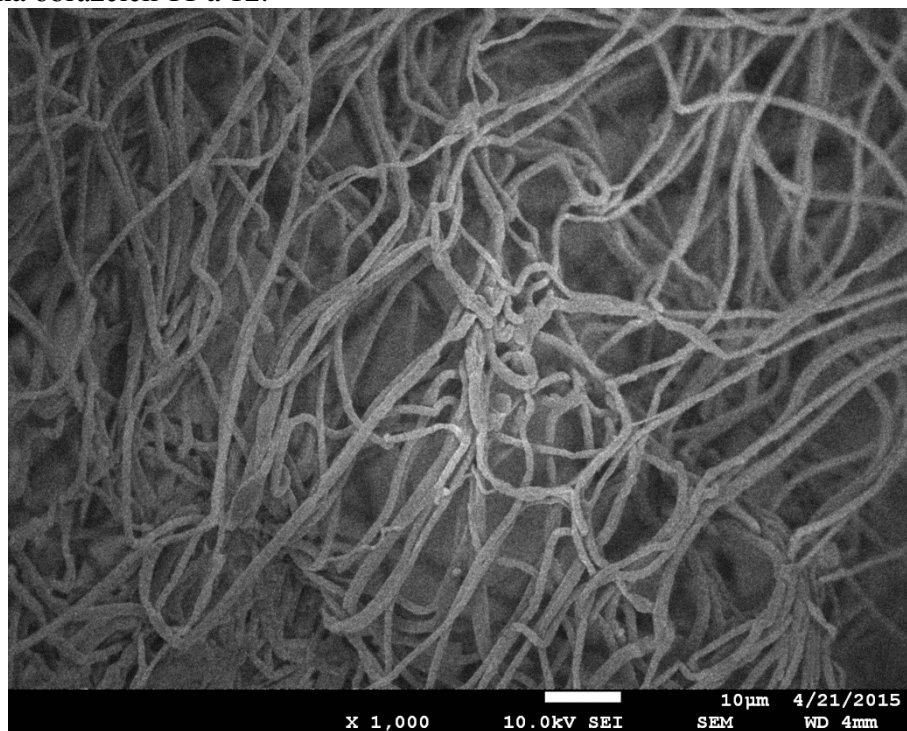
Z tabulky 13 a grafu 8 vyplývá, že i samotný lecithin jakožto hlavní složka liposomů i marinosomů vykazuje znatelný SPF faktor již při koncentraci okolo $2,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Koncentrace lecithinu ve vzorku je však okolo $8 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$, tedy čtyřikrát vyšší, SPF faktor se tedy pohybuje okolo 17, což již odpovídá hodnotě SPF v denních krémech.

Cholesterol a extrakt lipidů přispívají k hodnotě SPF jen minimálně. Naopak enkapsulované látky vykazují alespoň malý faktor ochrany proti slunečnímu záření. Nejvyšší SPF byl zjištěn u β -karotenu. Ostatní aktivní látky však vykazovaly také určitý SPF. Z olejů byl nejvyšší SPF vypočítán pro olej palmový, poté následoval olej olivový, který měl SPF téměř 5x nižší a kokosový olej nevykazoval téměř žádnou ochranu proti UVB záření.

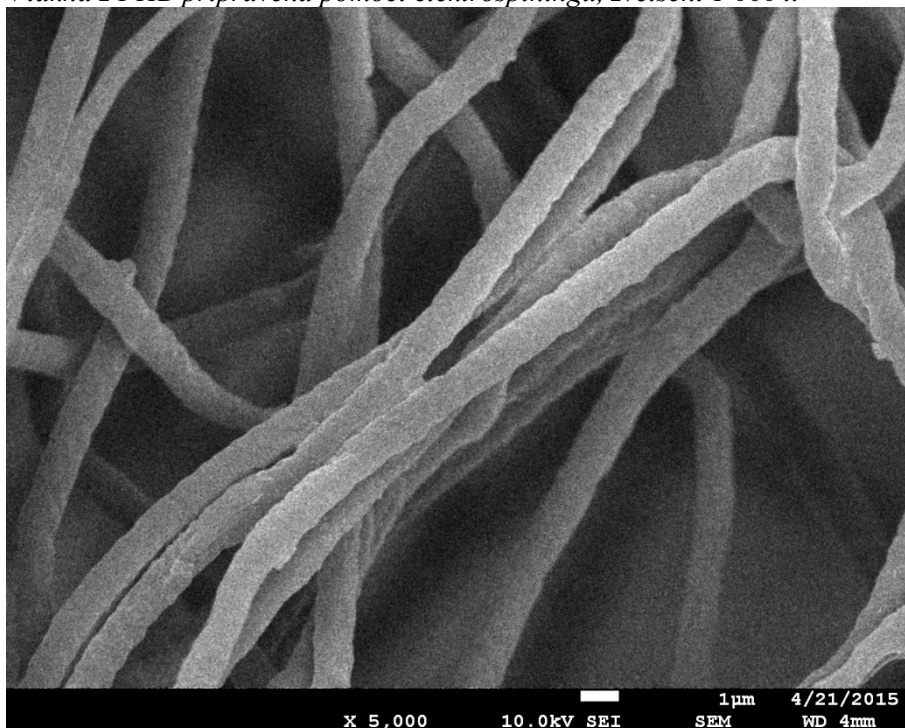
Přestože je tato metoda určena pro UVB filtry, byla naměřena významná hodnota absorbance i u UVA filtru (avobenzonu).

5.13 Vlákná

V práci byly provedeny pilotní experimenty zaměřené na přípravu hydrofobních nanovláken na bázi biopolymeru PHB. Byla otestována metoda přípravy pomocí elektrospinningu na laboratorní aparatuře, která byla sestavena a uvedena do provozu v průběhu řešení této práce. Vlákná z PHB připravená pomocí elektrospinningu byla vizualizována pomocí SEM a jsou zobrazena na obrázcích 11 a 12.



Obrázek 11: Vlákná z PHB připravená pomocí elektrospiningu, zvětšení 1 000 x



Obrázek 12: Vlákná z PHB připravená pomocí elektrospiningu, zvětšení 5 000 x

Na základě analýzy pomocí elektronového mikroskopu lze říci, že připravená vlákna vykazují průměr v rozměru jednotek mikrometrů až stovek nanometrů. Po optimalizaci přípravy vláken na bázi PHB se v navazující práci předpokládá funkcionalizace těchto vláken vybranými UV filtry a následná aplikace do ochranných prostředků.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá aplikací nanočástic a nanovláken s aktivní látkou v kosmetice. Jako částice byly připraveny liposomy a marinosomy, tedy liposomy s přídavkem lipidů vyextrahovaných z lososa. Tento extrakt byl podroben analýze pomocí tenkovrstvé chromatografie, která potvrdila, že byly vyextrahovány především triacylglyceroly, estery cholesterolu, volné mastné kyseliny i fosfolipidy. Poté analýza pomocí plynové chromatografie ukázala zastoupení mastných kyselin v extraktu. Nejvyšší zastoupení měly polynenasycené mastné kyseliny a mezi nimi byly zastoupeny i kyselina dokosaheptaenová (DHA) a eikosaheptaenová (EPA), které jsou obsaženy v lipidech mořských extraktů, pomáhají vyživovat pokožku a jsou protizánětlivé.

Pro přípravu částic bylo porovnáváno několik metod. U připravených částic byla sledována velikost a stabilita. Velikost částic u způsobů přípravy jak pomocí TLE, tak i sonikace byla pro část částic okolo 100 nm. Jako nejlepší byla vyhodnocena metoda přípravy pomocí sonikace, jelikož takto připravené částice vykazovaly vysokou stabilitu při skladování při laboratorní teplotě i po třech měsících.

Do částic byly enkapsulovány čtyři aktivní látky: α -tokoferol acetát, β -karoten, kyselina L-askorbová a katechin hydrát. Alfa-tokoferol acetát měl z vybraných látek nejnižší enkapsulační účinnost. Avšak pokud byl enkapsulován do marinosomů, tak se jeho enkapsulační účinnost zvýšila o 12 %. Naopak β -karoten vykazoval vysokou enkapsulační účinnost, která se u liposomů i marinosomů pohybovala okolo 70 %. Kyselina L-askorbová vykazovala nejvyšší enkapsulační účinnost - téměř 83 % v liposomech, kdy naopak přídavek extraktu lipidů z lososa způsobil snížení EU. Katechin hydrát měl velice podobnou enkapsulační účinnost (okolo 50 %) jak v liposomech, tak v liposomech s přídavkem lipidového extraktu z lososa.

U jednotlivých částic byla dále sledována dlouhodobá stabilita v modelových prostředích v rozmezí 0–25 dnů. Jako modelová prostředí byla vzhledem k potenciální aplikaci v kosmetice vybrána destilovaná voda a 2; 10 a 30% emulze palmového oleje ve vodě. Optimální prostředí pro α -tokoferol acetát je 10% emulze při enkapsulaci do liposomů, β -karoten by bylo vhodné enkapsulovat do liposomů a jako prostředí zvolit 2% emulzi, kyselinu L-askorbovou také do liposomů, přičemž složení emulze nehraje významnou roli. U katechin hydrátu by bylo vhodné použít jako prostředí 30% emulzi, kdy by bylo možné jej enkapsulovat jak do liposomů, tak do liposomů s 10% lipidovým extraktem z lososa.

Optimalizace složení emulzí zahrnovala výběr oleje, emulgátoru a procentové zastoupení oleje ve vodě. Pro další práci byl vybrán palmový olej stabilizovaný lecithinem. Finální výrobek byl pro lepší konzistenci zahuštěn karbomerem.

Dále byla u 10% emulzí palmového oleje ve vodě s 10% přídavkem částic s aktivní látkou sledována stabilita na analytické centrifuze. Výsledky tohoto měření ukázaly, že index nestability u všech zkoumaných vzorků byl v rozmezí 0,2–0,4. Jako nejstabilnější byl vyhodnocen vzorek emulze s přídavkem marinosomů s katechin hydrátem. Tyto hodnoty byly znovu proměřeny po osmi dnech, kdy došlo k mírnému zvýšení indexů nestability. Ten se pohyboval v rozmezí 0,4–0,5.

U jednotlivých komponent částic byly proměřeny hodnoty SPF („Sun Protection Factor“) pomocí metody in vitro. Samotný lecithin, jakožto hlavní složka liposomů, vykazoval SPF 17,

což je hodnota, která by měla odfiltrovat více než 93 % slunečního záření. K dostání jsou již krémy s SPF 15 (odfiltrují 93 %), SPF 30 (odfiltrují 97 %) a SPF 50 (98 %). Vyšší hodnota SPF dovoluje zůstat na slunci po delší dobu. SPF 17 tedy prodlužuje dobu, kdy dojde k zarudnutí 17krát. Velice důležitá je však i vrstva naneseného přípravku, jak často tuto vrstvu smýváme ve vodě a znovu obnovujeme. Cholesterol i lipidový extrakt z lososa neměly žádné významné protektivní účinky proti UVB záření. Z aktivních látek byl nejvyšší SPF 5 zjištěn u β -karotenu, poté α -tokoferol acetát s SPF 3,8 a srovnatelný SPF měla kyselina L-askorbová i katechin hydrát okolo 1,5. Dále byly proměřeny i porovnávané oleje, ze kterých vyšel nejlépe palmový olej, který měl SPF 6. Jako komerční UV filtry byly proměřeny UVA filtr avobenzon (Eusolex 9020) a UVB filtr octinoxat (Eusolex 2292). Octinoxat vykazoval relativně vysoký SPF 10 i při nízkých koncentracích. Přestože avobenzon je UVA filtr a metoda byla určena pro determinaci UVB protekce (290–320 nm), byla zjištěna i u něj jistá ochrana vůči UVB záření.

Celkově tedy můžeme říci, že i samotné částice, jak liposomy tak marinosomy, vykazovaly určitý protektivní efekt vůči UV záření. Přídavek α -tokoferol acetátu dodává kromě mírného zvýšení SPF také antioxidační aktivitu, péči o dehydratovanou kůži a prodlužuje trvanlivost výsledného produktu. Přídavek β -karotenu by zvýšil SPF a jelikož zvýrazňuje opálení, byly by takovéto částice vhodné pro opalovací krémy. Kyselina L-askorbová by při aplikaci s α -tokoferol acetátem zajišťovala jeho regeneraci a dále by samotný vitamín C působil antioxidačně a při redukci pigmentových skvrn.

Kromě částic byla připravena v rámci zaváděcích experimentů také nanovlákna na bázi polyhydroxybutyrátu. Byly provedeny pouze prvotní experimenty, kdy byla vlákna připravena pomocí elektrospiningu. Vlákna byla analyzována pomocí elektronového mikroskopu, průměr se prozatím pohybuje v jednotkách mikrometrů až stovkách nanometrů. V navazující práci by bylo vhodné vlákna podrobit dalším experimentům a aktivní složky enkapsulovat do jejich vnitřní části, popřípadě je imobilizovat na povrchu.

7 LITERATURA

1. ETTLER, Karel. *Fotoprotekce kůže: ochrana kůže před účinky ultrafialového záření*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2004, 133 s. ISBN 80-725-4463-2.
2. SAMBANDAN, Divya R. a Desiree RATNER. Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2011, vol. 64, issue 4, s. 748-758. DOI: 10.1016/j.jaad.2010.01.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962210000228>
3. ŠTORK, Jiří. *Dermatovenerologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2008, xv, 502, [2] s. ISBN 978-807-2623-716.
4. BAUMANN, Leslie a Leslie BAUMANN. *Cosmetic dermatology and medicine: principles and practice*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, c2009, xiv, 366 p. ISBN 978-0-07-164128-9.
5. GONZÁLEZ, Salvador, Manuel FERNÁNDEZ-LORENTE, Yolanda GILABERTE-CALZADA, Jean KRUTMANN, Daniel YAROSH a Dominique LEROY. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*. 2008, vol. 26, issue 6, s. 471-482. DOI: 10.1007/978-3-662-08585-1_48.
6. SALVADOR, A. a A. CHISVERT. Sunscreen analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2005, vol. 537, 1-2, s. 1-14. DOI: 10.1016/j.aca.2005.01.055. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005001169>
7. SILVIA DÍAZ-CRUZ, M., Marta LLORCA, Damià BARCELÓ a Damià BARCELÓ. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, vol. 27, issue 10, s. 873-887. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608001878>
8. MITCHNICK, Mark A., David FAIRHURST a Sheldon R. PINNELL. Microfine zinc oxide (Z-Cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999, vol. 40, issue 1, s. 85-90. DOI: 10.1016/s0190-9622(99)70532-3.
9. PINNELL, Sheldon R., David FAIRHURST, Robert GILLIES, Mark A. MITCHNICK a Nikiforos KOLLIAS. Microfine Zinc Oxide is a Superior Sunscreen Ingredient to Microfine Titanium Dioxide. *Dermatologic Surgery*. 2000, vol. 26, issue 4, s. 309-314. DOI: 10.1046/j.1524-4725.2000.99237.x
10. LAUTENSCHLAGER, Stephan, Hans Christian WULF a Mark R PITTELKOW. Photoprotection. *The Lancet*. 2007, vol. 370, issue 9586, s. 528-537. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60638-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607606382>
11. SARAF, Swarnlata a ChanchalDeep KAUR. In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy Research*. 2010, vol. 2, issue 1, s. 22-. DOI: 10.4103/0974-8490.60586. Dostupné z: <http://www.phcogres.com/text.asp?2010/2/1/22/60586>
12. MALSAWMTLUANGI, C., Deepak Kumar Nath, Italini Jamatia, Lianhimthangi Ralte, E. Zarzolian, Lalduhsanga Pachuau., Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. *J App Pharm Sci*. 2013; 3 (09): 150-151.

13. PINNELL, Sheldon R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003, vol. 48, issue 1, s. 1-22. DOI: 10.1067/mjd.2003.16. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203500056>
14. SIES, Helmut. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997, č. 82, s. 291-295.
15. KARRER, Paul, Ernst JUCKEL a Ernest A. BRAUDE. *Carotenoids*. Londýn, 1951.
16. LIANG, Jun, Yu-Xi TIAN, Fan YANG, Jian-Ping ZHANG a Leif H. SKIBSTED. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chemistry*. 2009, vol. 115, issue 4, s. 1437-1442. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.01.074. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609001319>
17. KASPERCZYK, Sławomir, Michał DOBRAKOWSKI, Janusz KASPERCZYK, Alina OSTAŁOWSKA, Jolanta ZALEJSKA-FIOLKA a Ewa BIRKNER. Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014, vol. 280, issue 1, s. 36-41. DOI: 10.1016/j.taap.2014.07.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X14002658>
18. *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. Editor Marc Paye, André O Barel. New York: Taylor, 2006, 1003 s. ISBN 15-744-4824-2.
19. CHEN, Yong-Jun, Rui-Min YUAN, Yong-Jian LIU, Hui-Jun YANG, Gui-Ying LIANG a Li-Xia TIAN. Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*. 2015, vol. 435, s. 431-436. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848614005213>
20. AUSMAN, Lyne M a Jean MAYER. Criteria and Recommendation for Vitamin C Intake. *Nutrition Reviews*. 1999, č. 7, s. 222-229.
21. PADAYATTY, Sebastian J. a Mark LEVINE. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *Canadian Medical Association. Journal*. 2001, roč. 164, č. 3, s. 353-355.
22. KOLOUCHOVÁ, Irena, Karel MELZUCH, Jan ŠMIDRKAL a Vladimír FILIP. Obsah resveratrolu v zelenině a ovoci. *Chemické Listy*. 2005, č. 99, s. 492-495.
23. SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2004, č. 98, s. 239-245.
24. Sigma-Aldrich chemical directory: (+)-Catechin hydrate. In: *Sigmaaldrich* [online]. [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1251?lang=en®ion=CZ>
25. TAVANO, Lorena, Rita MUZZALUPO, Nevio PICCI a Bruno de CINDIO. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: Gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, vol. 114, s. 82-88. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.058.

26. SHARMA, A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, vol. 154, issue 2, s. 123-140. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(97\)00135-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(97)00135-x).
27. LASIC, D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*. vol. 16, issue 7, s. 307-321. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01220-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779998012207>
28. BETZ, G, A AEPPLI, N MENSCHUTINA a H LEUENBERGER. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application☆. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, vol. 296, 1-2, s. 44-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.02.032>.
29. VEMURI, Sriram a C.T RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1995, vol. 70, issue 2, s. 95-111. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7).
30. DUA, J.S. 1, A. C. RANA a A. K. BHANDARI. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 2012, III, II, s. 14-20. Dostupné z: <http://www.technicaljournalonline.com/ijpsr/VOL%20III/IJPSR%20VOL%20III%20ISSUE%20II%20APRIL%20JUNE%202012/Article%204%20April%20June%202012.pdf>
31. RIAZ, Mohammad. Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996, roč. 19, č. 1, s. 65-77. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/7357141_Liposomes_preparation_methods
32. AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, Sang Woo JOO, Nosratollah ZARGHAMI, Younes HANIFEHPOUR, Mohammad SAMIEI, Mohammad KOUHI a Kazem NEJATI-KOSHKI. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013, vol. 8, issue 1, s. 102-. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. Dostupné z: <http://www.nanoscalereslett.com/content/8/1/102>
33. PATIL, Yogita P. a Sameer JADHAV. Novel methods for liposome preparation: review. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2014, roč. 177, s. 8-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.01>.
34. MOUSSAOUI, N, M CANSELL a A DENIZOT. Marinosomes®, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, vol. 242, 1-2, s. 361-365. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00217-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00217-x)
35. FOLCH, Jordi, I. ASCOLI, M. LEES, J. A. MEATH a F. N. LEBARON. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *The Journal of biological chemistry*. Baltimore, etc.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology [etc.], 1951, issue 191(2), s. 833-841. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/191/2/833.long>
36. HÁLKOVÁ, Jana a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001, 94 s. ISBN 80-864-9402-0.
37. CHRISTIE, William W. <http://lipidlibrary.aocs.org>. In: *Lipidlibrary.aocs* [online]. Scotland, 2011, June 27th, 2011 [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: http://lipidlibrary.aocs.org/GC_lipid/04_deriv/index.htm

38. ZACHAŘ, Pavel a David SÝKORA. Plynová chromatografie. In: [online]. [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
39. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
40. VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.
41. VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-86659-00-3.
42. SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
43. © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. *Zetasizer Nano Series User Manual*. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
44. *Handbook of cosmetic science and technology*. 2nd ed. Editor André O Barel, Marc Paye. New York: Marcel Dekker, 2001, 886 s. ISBN 08-247-0292-1.
45. CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004-03-19, vol. 107, 2-3, s. 125-155. DOI: 10.1016/S0001-8686(03)00115-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868603001155>
46. TAL-FIGIEL, B. The Formation of Stable W/O, O/W, W/O/W Cosmetic Emulsions in an Ultrasonic Field. *Chemical Engineering Research and Design*. 2007, vol. 85, issue 5, s. 730-734. DOI: 10.1205/cherd06199. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263876207731040>
47. Stanovení sedimentační stability emulzí. In: [online]. [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf
48. VANĚK, Ondřej a Karel BEZOUŠKA. Analytická centrifuga a její využití v biochemické laboratoři. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, roč. 104, č. 12, 1155–1162.
49. DUTTA, Ajoy Kumar, Naoki KAWAMOTO, Gaku SUGINO, Hironori IZAWA, Minoru MORIMOTO, Hiroyuki SAIMOTO a Shinsuke IFUKU. Simple preparation of chitosan nanofibers from dry chitosan powder by the Star Burst system. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 97, issue 2, s. 363-367. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.010>.
50. BHATTARAI, Narayan, Dennis EDMONDSON, Omid VEISEH, Frederick A. MATSEN a Miqin ZHANG. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, issue 31, s. 6176-6184. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.0>
51. BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, vol. 28, issue 3, s. 325-347. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.

52. BURGESS, Rob. *Understanding nanomedicine: an introductory textbook*. Singapore: Pan Stanford Publishing, c2012, xxviii, 492 s. ISBN 978-981-4316-38-5.
53. TAYLOR, G. Electrically Driven Jets. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1969, vol. 313, issue 1515, s. 453-475. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspa.1969.0205>.
54. FOUDA, Moustafa M.G., M.R. EL-AASSAR a Salem S. AL-DEYAB. Antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibers embedded silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 92, issue 2, s. 1012-1017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.047>.
55. BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, vol. 28, issue 3, s. 325-347. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
56. SOMBATMANKHONG, Korakot, Neeracha SANCHAVANAKIT, Prasit PAVASANT a Pitt SUPAPHOL. Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend. *Polymer*. 2007, vol. 48, issue 5, s. 1419-1427. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.01.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386107000511>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV záření – ultra fialové záření

VR/IR – viditelné a infračervené záření

DNA/RNA – deoxy/ribonukleová kyselina

SPF – ochranný faktor proti slunečnímu záření

ROS – reaktivní druhy kyslíku

LDL – nízkohustotní lipidy

ULV/MLV – jednolamelární/multilamelární vesikly

SUV/LUV – malé a velké unilamelární vesikly

REV – liposomy připravené metodou odpařování reverzní fáze

FPV – liposomy připravené pomocí Fresch pressu

TLE – odpařování na tenké vrstvě

RP-TLE – odpařování na tenké vrstvě s reverzní fází

EIV – liposomy připravené pomocí ethanolového popřípadě etherového vstříkávání

SFA – nasycené mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

EPA – eikosapentaenová kyselina

DHA – dokosahexaenová kyseliny

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

GC – plynová chromatografie

FID – plamenově ionizační detektor

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází

DAD – detektor s diadovým polem

PCS – Fotonová korelační spektroskopie

DLS – dynamický rozptyl světla

PHB – polyhydroxybutyrát

PHA – polyhydroxyalkanoáty

ND – nedetekováno

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Graf distribuce liposomů připravených pomocí metody TLE

Příloha 2: Graf distribuce liposomů s 2,5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE

Příloha 3: Graf distribuce liposomů s 5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE

Příloha 4: Graf distribuce liposomů s 10% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE

Příloha 5: Graf distribuce liposomů s 20% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE

Příloha 6: Graf distribuce liposomů připravených pomocí ultrazvuku

Příloha 7: Graf distribuce liposomů s 2,5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku

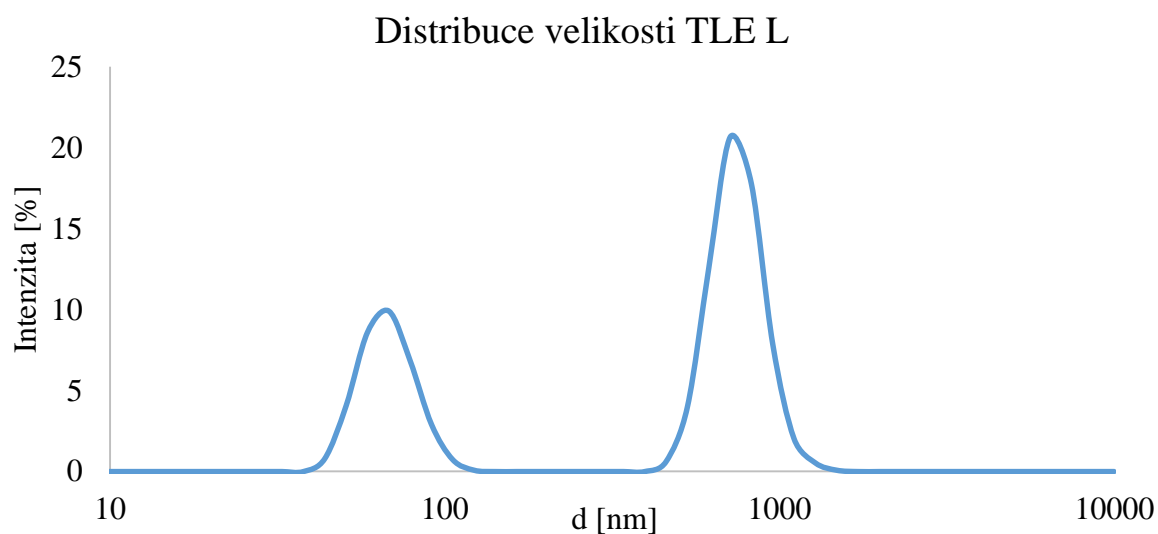
Příloha 8: Graf distribuce liposomů s 5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku

Příloha 9: Graf distribuce liposomů s 10% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku

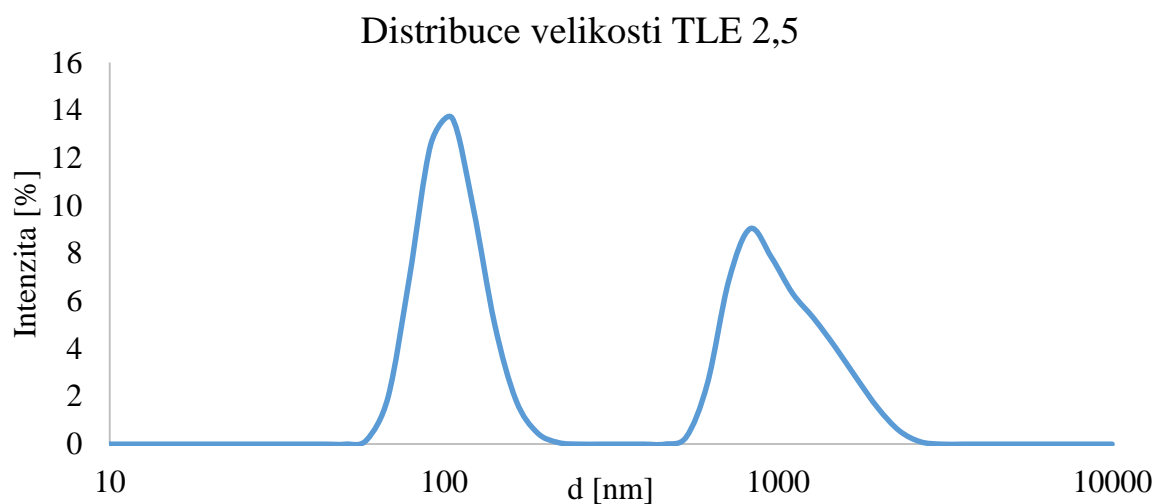
Příloha 10: Graf distribuce liposomů s 20% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku

10PŘÍLOHY

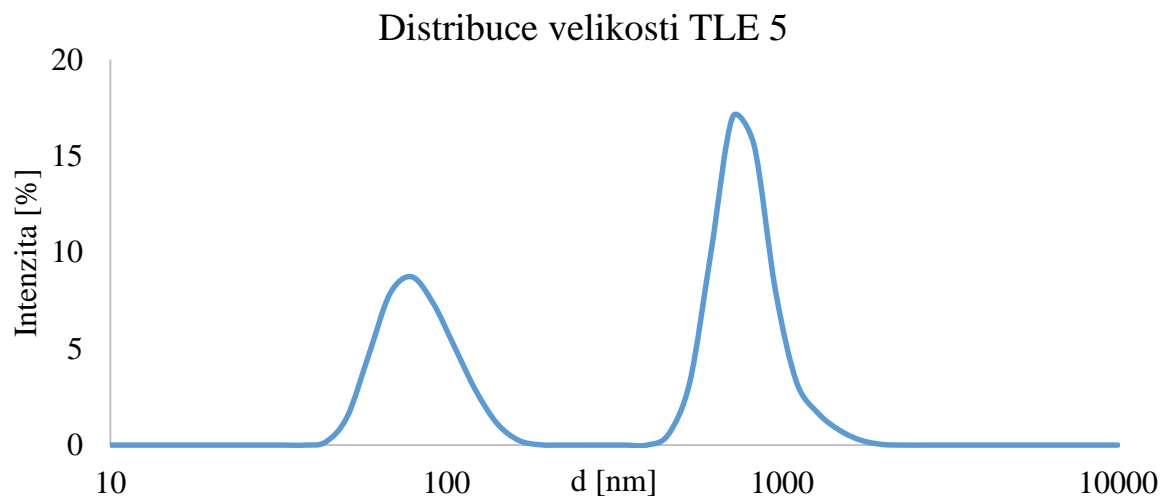
Příloha 1: Graf distribuce liposomů připravených pomocí metody TLE



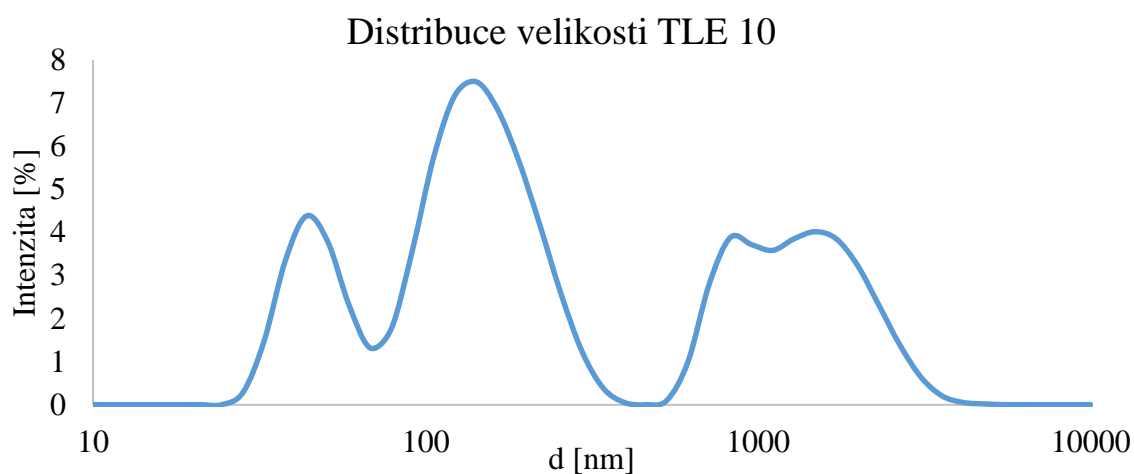
Příloha 2: Graf distribuce liposomů s 2,5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE



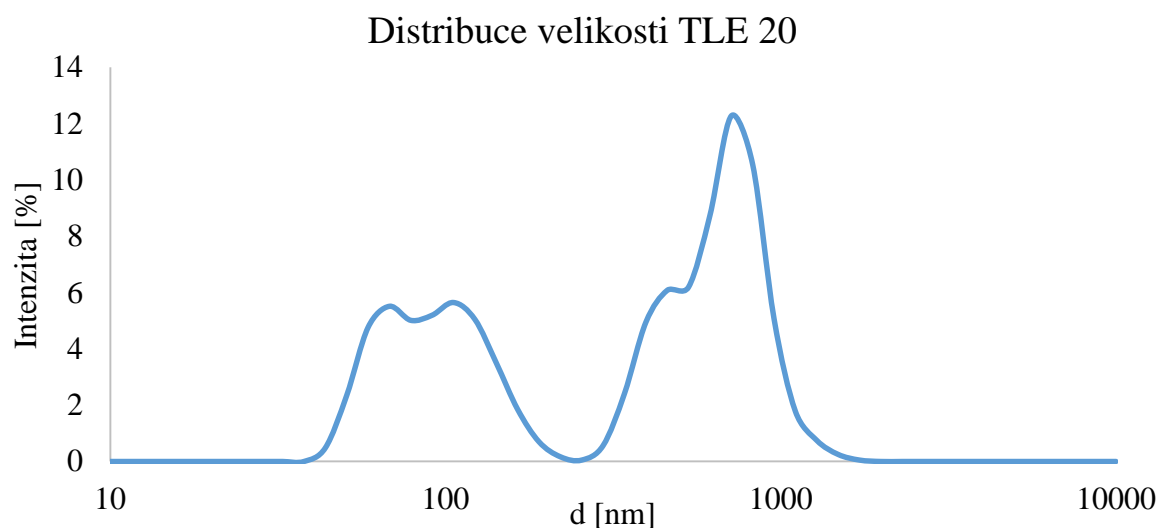
Příloha 3: Graf distribuce liposomů s 5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE



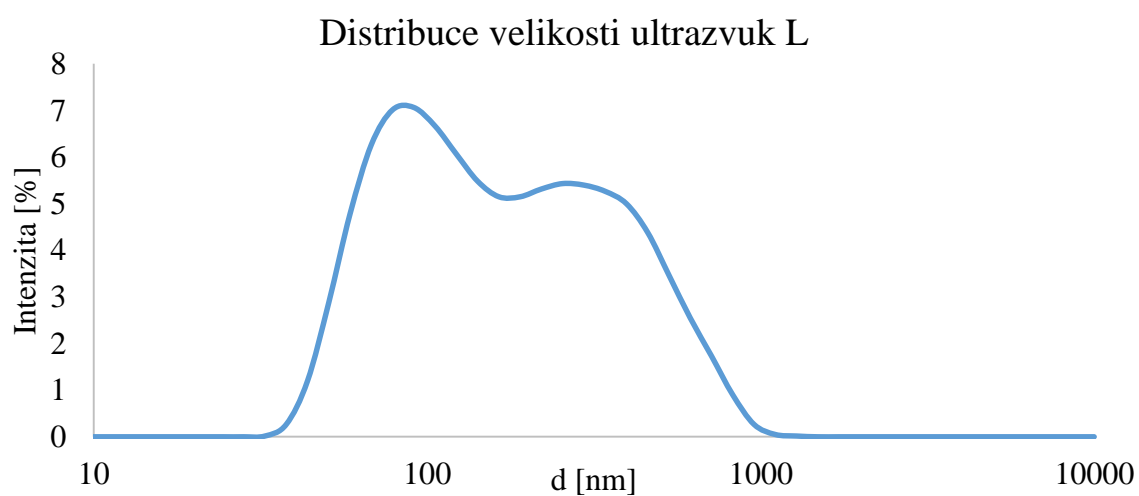
Příloha 4: Graf distribuce liposomů s 10% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE



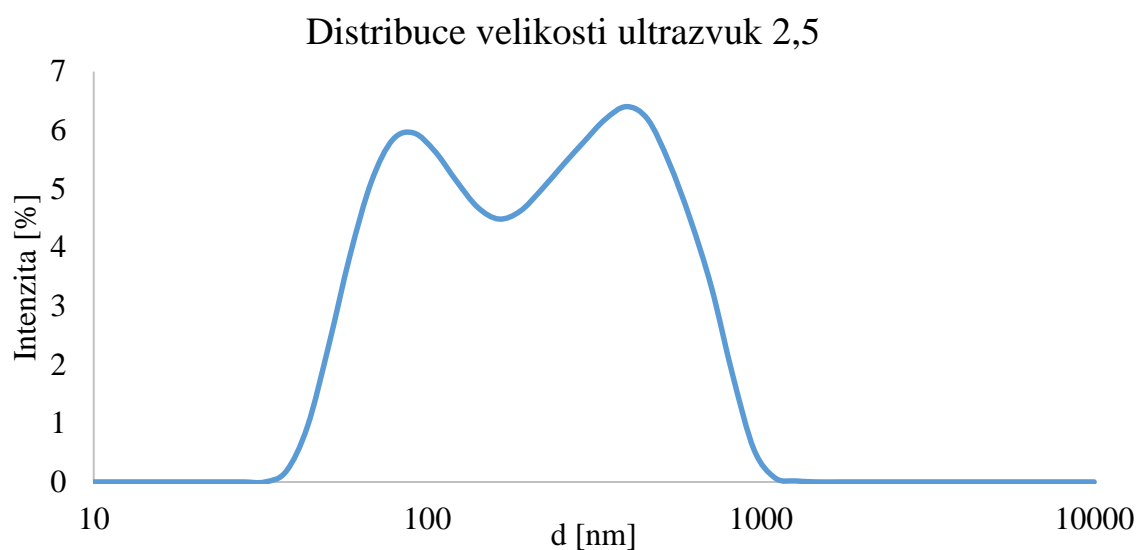
Příloha 5: Graf distribuce liposomů s 20% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí metody TLE



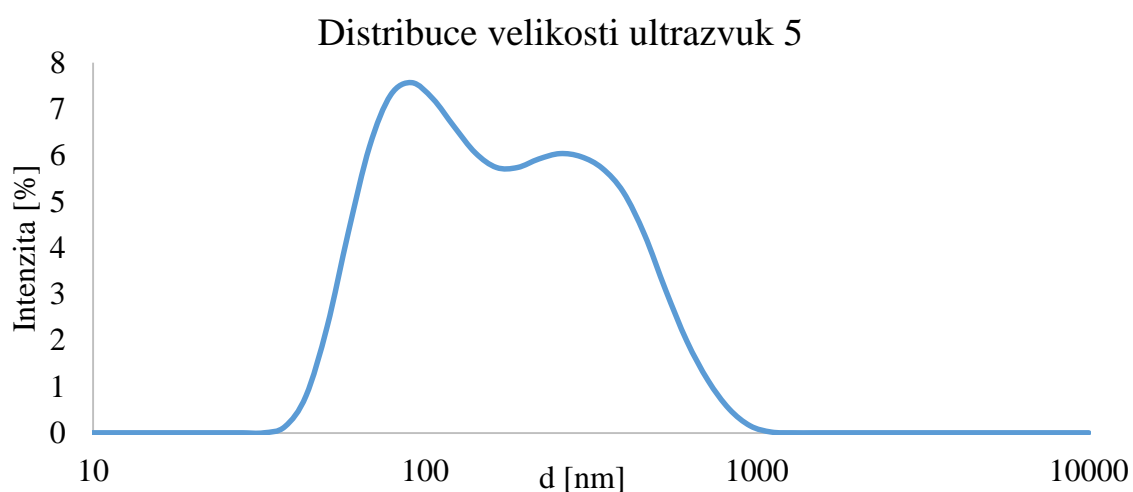
Příloha 6: Graf distribuce liposomů připravených pomocí ultrazvuku



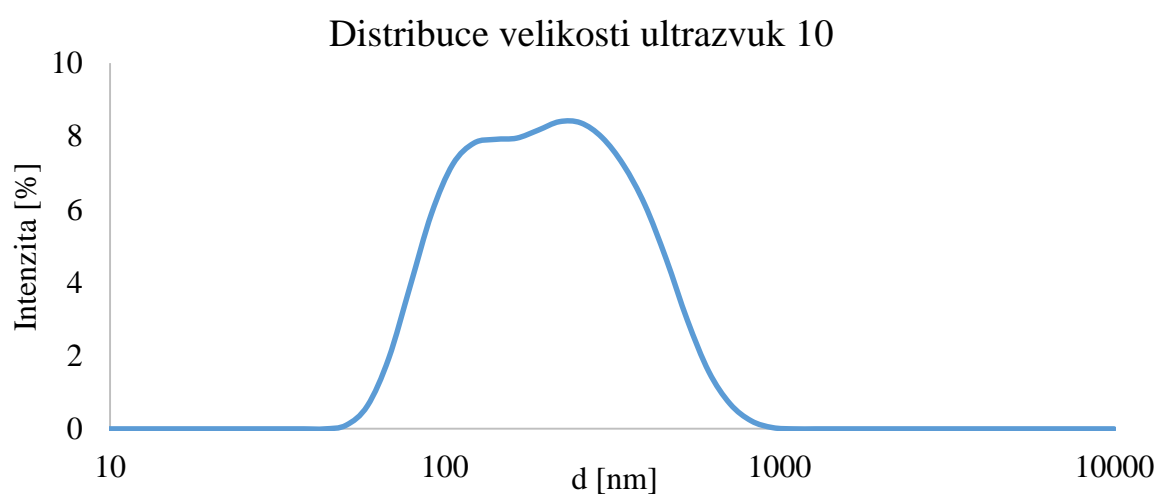
Příloha 7: Graf distribuce liposomů s 2,5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku



Příloha 8: Graf distribuce liposomů s 5% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku



Příloha 9: Graf distribuce liposomů s 10% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku



Příloha 10: Graf distribuce liposomů s 20% přídavkem extraktu z lososa připravených pomocí ultrazvuku

